

Aus dem Zentrum für Humangenetik
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Grzeschik

Analyse von Proteininteraktionen beim Bardet-Biedl-Syndrom mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin



Dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg

Vorgelegt von

Andrea Hermesmeier

aus Arolsen

Marburg, 2006

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

Am: 21.09.2006.

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. K.-H. Grzeschik

Korreferent: Prof. Dr. R. Müller

I Abkürzungen	1
II Einleitung	3
II.1 Übergewicht und Adipositas	3
II.1.1 Definition und Messmethoden	3
II.1.2 Erscheinungsformen der Adipositas	4
II.1.3 Epidemiologische Daten zur Adipositas	5
II.1.4 Begleit- und Folgeerkrankungen	6
II.1.5 Ökonomische Konsequenzen der Adipositas	8
II.1.6 Ursachen und Erklärungsansätze für Übergewicht und Adipositas	8
II.1.7 Molekulargenetik der Adipositas	9
II.1.8 Syndromale Adipositas	11
II.2 Das Bardet-Biedl-Syndrom	13
II.2.1 Klinische Erscheinungsform und Definition	13
II.2.2 Epidemiologische Daten zum Bardet-Biedl-Syndrom	17
II.2.3 Die genetischen Grundlagen des Bardet-Biedl-Syndroms	18
II.2.3.1 Die verschiedenen BBS-Gene	18
II.2.3.2 Genetische Modifikationen und triallelische Vererbung beim Bardet-Biedl-Syndrom	19
II.2.3.3 Die verschiedenen BBS-Proteine	20
II.2.4 BBS4: Gen und Protein	22
II.3 Ziele dieser Arbeit	25
II.3.1 Proteininteraktionen der BBS-Proteine	25
III Materialien	27
III.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	27
III.2 Chemikalien	29
III.3 Basis-Lösungen	30
III.4 Medien	31
III.4.1 Bakterienmedien	31
III.4.2 Hefemedien:	33
III.5 Stämme	34
III.5.1 Hefestämme	34
III.5.2 Bakterienstämme:	38
III.6 Plasmide	38

III.7 Oligonukleotide	40
III.8 Enzyme und Antikörper	41
III.9 Kits	42
III.10 Genbibliothek und mRNA	42
III.11 Verwendete Datenbanken im Internet	42
IV Methoden	43
IV.1 Molekularbiologische Methoden	43
IV.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA	43
IV.1.1.1 Miniplasmid Isolierung aus <i>E. coli</i>	43
IV.1.1.2 Säulenpräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	44
IV.1.2 Reinigung und DNA-Präzipitation	44
IV.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung	45
IV.1.4 Analyse von DNA durch Agarosegelelektrophorese	45
IV.1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	45
IV.1.6 DNA-Klonierung	46
IV.1.6.1 cDNA-Synthese	46
IV.1.6.2 PCR	46
IV.1.6.3 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	47
IV.1.6.4 Ligation	47
IV.1.7 Transformation	48
IV.1.7.1 Herstellung chemisch-ultrakompetenter <i>E. coli</i>	48
IV.1.7.2 Herstellung von Gefrierkulturen elektrokompeter <i>E. coli</i>	49
IV.1.7.3 Herstellung von sofort zu verwendenden elektrokompenten <i>E. coli</i>	49
IV.1.7.4 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i>	50
IV.1.7.5 Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i>	50
IV.2 Methoden mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
IV.2.1 Genomische DNA-Päparation aus <i>S. cerevisiae</i>	51
IV.2.2 Plasmid-Extraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	52
IV.2.3 Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	52
IV.2.4 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	53
IV.2.5 Mating von <i>S. cerevisiae</i>	54
IV.2.5.1 Mating auf einer YPD-Agar-Platte	54
IV.2.5.2 „Small-scale“-Mating	54
IV.2.6 β -Galactosidase-Aktivitätstests	55
IV.2.6.1 LacZ-Filter-Kolonie-Assay für Hefen	55
IV.2.6.2 Flüssig-lacZ-Assay	55
IV.3 Proteinbiochemische Methoden	56
IV.3.1 SDS-PAGE	56

IV.3.2 Coomassie-Färbung	57
IV.3.3 Semidry-Blotting	58
IV.4 Immunologische Detektionsverfahren.....	59
IV.4.1 Western-Blot.....	59
IV.5 Sequenzierung	59
IV.5.1 Probenvorbereitung.....	60
IV.5.1.1 Sequenzreaktion	60
IV.5.1.2 Aufreinigung der Sequenzreaktion	61
IV.5.2 Sequenzierung.....	61
V Ergebnisse.....	63
V.1 „Two-Hybrid-Screen“ mit BBS4.....	63
V.1.1 Prinzip des Two-Hybrid-Screens	63
V.1.2 Eigenschaften der Genbibliothek	64
V.1.3 Vorarbeiten zur Durchführung des Two-Hybrid-Screens.....	65
V.1.3.1 PCR und Klonierung	65
V.1.3.2 Sequenzanalyse der Klonierungsprodukte	66
V.1.3.3 Transformation der Two-Hybrid-Hefestämme	66
V.1.3.4 Durchführung eines Westernblots für BBS4.....	67
V.1.3.5 Test auf unspezifische transkriptionelle Aktivierung.....	68
V.1.4 Test auf Toxizität der Konstrukte	69
V.1.4.1 Ermittlung der Mating-Effizienz	70
V.1.5 Durchführung des Two-Hybrid-Screens	70
V.1.6 Auswertung der positiven Klone.....	73
V.1.7 Verifizierung der positiven Klone.....	73
V.1.8 Falsifizierung der falsch-positiven Klone	76
V.1.9 Sequenzierung und Identifizierung der positiven Klone.....	76
V.1.9.1 BLAST-Ergebnisse der positiven Klone.....	77
V.1.9.2 Mehrfach detektierte Proteine	82
V.1.9.3 OMIM-Recherche zu den positiven Klonen	83
V.1.10 Direkte Tests auf Interaktionen.....	86
V.1.11 Quantifizierung der Interaktionen	89
VI Diskussion	90
VI.1 Diskussion zum Two-Hybrid-Screen mit BBS4	90
VI.1.1 Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit BBS4 und der humanen mRNA- Genbibliothek (Die Namen der Proteine sind aus der OMIM-Datenbank übernommen)	90
VI.1.1.1 Homo sapiens aldolase B	91
VI.1.1.2 Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3)	91
VI.1.1.3 Pericentriolar material 1 (PCM1).....	91

VI.1.1.4 Homo sapiens flotillin 1 (FLOT1)	92
VI.1.1.5 Homo sapiens endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1)	92
VI.1.1.6 Homo sapiens aldolase A, fructose-bisphosphate	93
VI.1.1.7 Homo sapiens NADH-Dehydrogenase	93
VI.1.1.8 Homo sapiens Short chain L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase	93
VI.1.1.9 Homo sapiens, Similar to catalase	94
VI.1.1.10 Homo sapiens 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1)	94
VI.1.1.11 Homo sapiens calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha (CALCA)	94
VI.1.1.12 Homo sapiens actin beta (ACTB)	95
VI.1.1.13 Homo sapiens dynactin 1	95
VI.1.1.14 Homo sapiens tetratricopeptide repeat protein 4 (TTC4)	97
VI.1.1.15 Homo sapiens ATPase, H ⁺ transporting	97
VI.1.1.16 Homo sapiens sterol carrier protein 2 (SCP2)	97
VI.1.1.17 Homo sapiens enolase 1 (alpha) (ENO1)	97
VI.1.1.18 Homo sapiens formin homology 2 domain containing 1 (FHOD1) ...	98
VI.1.1.19 Homo sapiens paired box transcription factor (PAX2)	98
VI.1.1.20 Homo sapiens pM5 protein (PM5)	98
VI.1.2 Weiterführende Versuche	102
VI.1.2.1 Quantifizierung der Interaktionen	102
VI.1.2.2 Weitere Verifizierungsmöglichkeiten	102
VI.1.2.3 Bestätigung der Interaktionen mit der Coimmunopräzipitation	103
VI.1.2.4 Identifizierung der interagierenden Domänen	103
VI.1.2.5 Regulation der Interaktion	103
VI.1.2.6 Mutationsanalyse	103
VI.1.3 Ergebnisse der direkten Tests mit den einzelnen BBS-Proteinen	104
VI.1.3.1 Quantifizierung der Interaktion zwischen BBS4 und BBS7/BBS2 ...	104
VI.1.4 Weiterführende Versuche	105
VI.1.4.1 Biochemische Bestätigung der direkten Tests	105
VI.1.4.2 Überprüfung der Kolo-kalisation der BBS-Proteine	105
VI.1.4.3 Nachweis der interagierenden Domänen	105
VI.1.4.4 Regulation der Interaktion	106
VII Zusammenfassung	107
VIII Literatur	109
IX Anhang	121
IX.1 Lebenslauf	121
IX.2 Akademische Lehrer	123
IX.3 Danksagung	124
IX.4 Ehrenwörtliche Erklärung	125

I Abkürzungen

A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
APS	Ammoniumpersulfat
BBS	Bardet-Biedl-Syndrom
BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
Ca.	Circa
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
g	Gramm
kb	Kilobasen
KHK	koronare Herzerkrankung
min	Minute
OD	Optische Dichte
OMIM	Online Mendelian Inheritance In Man
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCI	Phenol-Chloroform-Isopropylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Ionen-Konzentration
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

s	Sekunde
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
ssDNA	Salmon sperm DNA
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v. a.	Vor allem
WHO	World Health Organization
WHR	Waist-to-hip-ratio
Wt	Wildtyp

II Einleitung

II.1 Übergewicht und Adipositas

In den letzten Jahrzehnten hat die Zahl übergewichtiger und adipöser Personen in den westlichen Industrienationen permanent zugenommen. Mittlerweile spricht die WHO von epidemischen Ausmaßen. Auch in Schwellenländern wächst der Anteil der Übergewichtigen. Als besonders bedrohlich einzustufen ist, dass der Anteil der übergewichtigen Kinder und Jugendlichen sich kontinuierlich vergrößert.

II.1.1 Definition und Messmethoden

Der Anteil des Fettgewebes am Körpergewicht definiert die Adipositas. Adipositas besteht dann, wenn der Anteil der Fettmasse am Körpergewicht bei Frauen 25 % und bei Männern 20 % übersteigt (Quelle: Austrian Health Consilium, 2004). Allerdings ist diese Definition im klinischen Alltag von nur geringem Nutzen, da die Untersuchungen zur genauen Bestimmung des Fettanteils aus verschiedenen Gründen nicht standardmäßig anwendbar sind. Als Goldstandard gilt die Densiometrie, wobei eine Gewichtsanalyse unter Wasser stattfindet, was sehr umständlich ist. Eine Methode zur Bestimmung eines Schätzwertes für den Körperfettanteil ist die bioelektrische Impedanzanalyse (BIA). Sie ist jedoch nicht geeignet bei extrem adipösen Menschen und zur Messung kurzfristiger Veränderungen und sie ist sehr störanfällig durch die Abhängigkeit vom Hydrationszustand der Untersuchten. Auch die Messung der Hautfaltendicke kann zur Schätzung des Körperfettanteils benutzt werden, eine Methode, die allerdings recht ungenau und schlecht reproduzierbar ist. Weitere Methoden, die aber kaum oder nicht angewandt werden, sind spezielle Computer- und Kernspintomographieuntersuchungen (hohe Strahlenbelastung, hohe Kosten und sehr aufwändig) (Heymsfield *et al.*, 1998).

Inzwischen ist statt der aufwendigen Meßmethoden der Body-Mass-Index (BMI) als quantitatives Standardmaß international etabliert. Dieser Index ist weitgehend körperhöhenbereinigt und korreliert stark (bis zu 95 %) mit der Gesamtfettmenge (Hebebrand *et al.*, 1994). Der BMI ist definiert als das Körpergewicht (in Kilogramm) dividiert durch das Quadrat der Körpergröße (in Meter):

$$\text{BMI} = \frac{\text{Gewicht [kg]}}{\text{Größe}^2 [\text{m}^2]}$$

Zur Bestimmung des Ausmaßes des Übergewichts bzw. der Adipositas hat die WHO Grenzwerte festgelegt (Tab. 1).

Tab. 1: Grenzwerte zur Gewichtsklassifizierung nach Definition der WHO	
Bezeichnung	BMI (Body-Mass-Index) [kg/m²]
Normalgewicht	18,5-24,9
Übergewicht	25,0-29,9
Adipositas Grad I	30,0-34,9
Adipositas Grad II	35,0-39,9
extreme Adipositas Grad III	≥ 40

Es ist zu beachten, dass für Kinder diese Definition nicht gilt, da ihr Gewicht stark alters- und geschlechtsabhängig ist. Zur Einordnung des Gewichts werden daher alter- und geschlechtsspezifische Perzentile zum Vergleich angelegt. Ein Befund gilt als auffällig, wenn er über der 90%-Perzentile liegt und als sehr auffällig, wenn er über der 97 %-Perzentile liegt.

II.1.2 Erscheinungsformen der Adipositas

Man unterscheidet *primäre* und *sekundäre* Formen des Übergewichts: bei der *primären* Form ist die Energiezufuhr erhöht und der Energieverbrauch in Relation dazu niedrig. Bei der *sekundären* oder *syndromalen* Form liegt ein angeborener oder erworbener Defekt im Metabolisierungs-Regelkreis vor, z. B. beim Prader-Willi- und beim Bardet-Biedl-Syndrom, mit dem sich diese Arbeit beschäftigt.

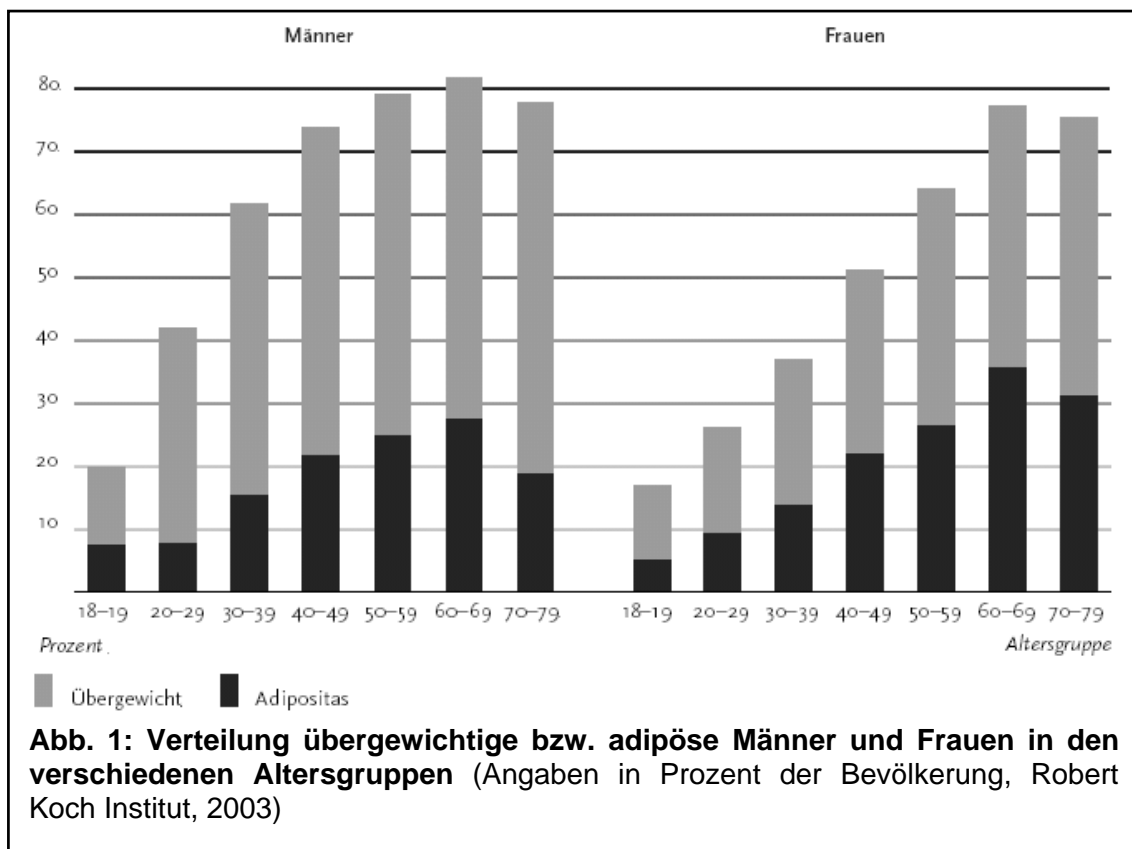
Aus klinischer Sicht ist des Weiteren die Unterscheidung in eine *gynoid*e und eine *androide* Form der Adipositas sinnvoll. Diese zwei Formen charakterisieren das Fettverteilungsmuster; als Maß dient das Verhältnis vom Taillen- zum Hüftumfang (Waist-to-hip-ratio, WHR). Dieses Verhältnis ist bei androiden Form größer (zentrale

Fettverteilung) als bei der gynoiden (periphere Fettverteilung). Die androide Form ist mit einem weitaus größeren Risiko für Folgeerkrankungen verbunden.

II.1.3 Epidemiologische Daten zur Adipositas

Epidemiologische Daten zu Übergewicht und Adipositas sind schwer zu finden und divergieren teilweise erheblich. Die WHO gibt an, dass weltweit mehr als 1 Milliarde Personen übergewichtig sind und von ihnen mindestens 300 Millionen adipös. Europaweit wird ein Anstieg der Adipositasprävalenz Richtung Süden und Osten beobachtet. In Deutschland wird seit Jahrzehnten ein Anstieg der Prävalenz beobachtet. So wies im Jahre 1999 nur noch die Hälfte bis ein Drittel der Bevölkerung einen medizinisch gewünschten BMI bis 24,9 auf. Studien aus den Jahren 1998 und 1999 zufolge waren 18,3 bis 24,5 % der Bundesbürger mit einem BMI größer/gleich 30 adipös und 31,1 bis 48,7 % mit einem BMI zwischen 25 und 29,89 mäßig übergewichtig. Am 27. April 2004 teilte das Statistische Bundesamt mit, dass bereits 49 % der Deutschen über 18 Jahre im Jahr 2003 Übergewicht hatten. Das war ein Prozentpunkt mehr als 1999. Im internationalen Vergleich liegt Deutschland damit auf Platz vier; mehr dicke Menschen finden sich nur in den USA, in Kuwait und Russland (Quelle: WHO, 2000). Betrachtet man die Verbreitung von Übergewicht und Adipositas in den Altersgruppen, dann findet sich bei Männern in allen Altersgruppen ein deutlich größerer Anteil von Übergewichtigen als bei Frauen (Abb. 1). Im Alter von 30 bis unter 60 Jahren ist Adipositas bei Frauen und Männern etwa gleich häufig, bei den über 60-Jährigen ist Adipositas bei Frauen häufiger.

Zwischen 10 und 20 % der Jugendlichen in Deutschland sind als übergewichtig bzw. adipös einzuordnen (Quelle: Statistisches Bundesamt, 2000). Einen interessanten Aspekt stellt die Abhängigkeit des Gewichts vom sozialen Status dar. Übergewicht ist in höheren sozialen Schichten mit höherem Ausbildungsstand sehr viel seltener. Dies mag auf einer stärkeren Stigmatisierung von Übergewicht, einem höheren Gesundheitsbewusstsein und einer verstärkten sportlicher Freizeitaktivität in diesen Schichten begründet sein.



Außerdem ergaben Untersuchungen, dass auch die Partnerwahl in Bezug auf das Körpergewicht eine Richtung aufweist. So heiraten schlanke Menschen und übergewichtige Menschen häufiger untereinander. Auf diese Weise kommt eine Selektion in Bezug auf das Körpergewicht zustande. Genetische Mechanismen der Gewichtsregulation werden in den Familien fixiert (Hebebrand *et al.*, 2001).

II.1.4 Begleit- und Folgeerkrankungen

Hier sind zahlreiche Erkrankungen zu nennen, die teilweise direkt auf das Übergewicht zurückzuführen sind, und solche, bei denen ein multifaktorielles Bedingungsmodell vermutet wird, in dem Adipositas eine große Rolle spielt. Immer häufiger wird das metabolische Syndrom diagnostiziert, welches definiert wird durch die Symptome Übergewicht, Hypertonus, Hyperlipidämie und Hyperurikämie. Dieses Syndrom geht überdurchschnittlich häufig mit einer koronaren Herzerkrankung (KHK) und Diabetes mellitus Typ 2 einher.

Hypertonus: stellt die häufigste Begleiterkrankung der Adipositas dar und ist gleichzeitig ein Risikofaktor für zahlreiche Gefäßerkrankungen.

KHK und Herzinsuffizienz: Die Renfrew-Paisley-Studie - eine über 20 Jahre prospektiv durchgeführte Studie mit 15000 Probanden zw. 45 und 64 Jahren - ergab, dass bei Adipösen die Rate der KHK um ca. 60 % ansteigt. Herzinsuffizienz ist eine häufige Komplikation der KHK und infolgedessen eine häufige Todesursache in Abhängigkeit von der Dauer der Adipositas. Die Rate der Herzinsuffizienz ist bei Adipösen doppelt so hoch wie bei Normalgewichtigen.

Typ2-Diabetes: Diese Erkrankung gehört zu den folgenreichsten und häufigsten in den Industrienationen; 90 % der Typ2-Diabetiker sind übergewichtig! (WHO, 2003)

Apoplex: Untersuchungen ergaben, dass das Schlaganfallrisiko bei Probanden mit einem BMI über 30 um 40 % höher (Renfrew-Paisley-Studie) ist.

Krebserkrankungen: Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Körpergewicht und der Inzidenz eines Karzinoms. Bei adipösen Frauen ist vor allem das Risiko erhöht, an Endometrium-, Zervix-, Ovarial- oder postmenopausalem Brustkrebs zu erkranken. Bei adipösen Männern liegt ein erhöhtes Risiko für Darm- und Prostatakrebs vor (Quelle: Deutsche Adipositas-Gesellschaft). Es ist Gegenstand der Diskussion, ob dieser Effekt v.a. auf die erhöhte Hormonproduktion im Fettgewebe oder auf Ernährungseffekte zurückzuführen ist.

Weitere Folgeerkrankungen der Adipositas sind: Fettstoffwechselstörungen, Schlafapnoe-Syndrom, Hyperurikämie und Gicht, Gallenblasenerkrankungen, orthopädische Erkrankungen und die nicht zu vernachlässigenden psychosozialen Komplikationen.

Sogar die Mortalität ist bei übergewichtigen Personen gegenüber normalgewichtigen erhöht, die Angaben zum Ausmaß variieren allerdings stark (Tab. 2).

Tab. 2: Erhöhung des Mortalitätsrisikos nach BMI-Klassen nach Canada Fitness survey (2001)	
BMI-Wert [kg/m²]	Mortalitätsrisiko erhöht um
25-29,9	16 %
30-34,9	25 %
≥ 35	296 %

II.1.5 Ökonomische Konsequenzen der Adipositas

Die direkten Kosten, die im Gesundheitssystem infolge der Adipositas entstehen, sind schwer zu beziffern. Schätzungen der WHO gehen davon aus, dass durch die Adipositas und die mit ihr assoziierte Morbidität und Mortalität Kosten entstehen, welche rund 5-8% der gesamten Gesundheitsausgaben in den Industrieländern verschlingen. Allein für die Behandlung der Folgeerkrankung Diabetes wurden im Jahr 2004 in Deutschland ca. 15 Milliarden Euro ausgegeben.

II.1.6 Ursachen und Erklärungsansätze für Übergewicht und Adipositas

Angesichts dieser prekären Lage mit ihren enormen Folgen für das Gesundheitssystem und die Ökonomie eines Landes ergibt sich die Notwendigkeit der intensiven Forschung über die Gewichtsregulation und die Ursachen ihrer Fehlfunktion, die zu Übergewicht führen kann. Die Komplexität der Erkrankung Adipositas lässt vermuten, dass eine multifaktorielle Pathogenese zugrunde liegt. Forschungsergebnisse bestätigen diese Vermutung und zeigen, dass sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse beteiligt sind.

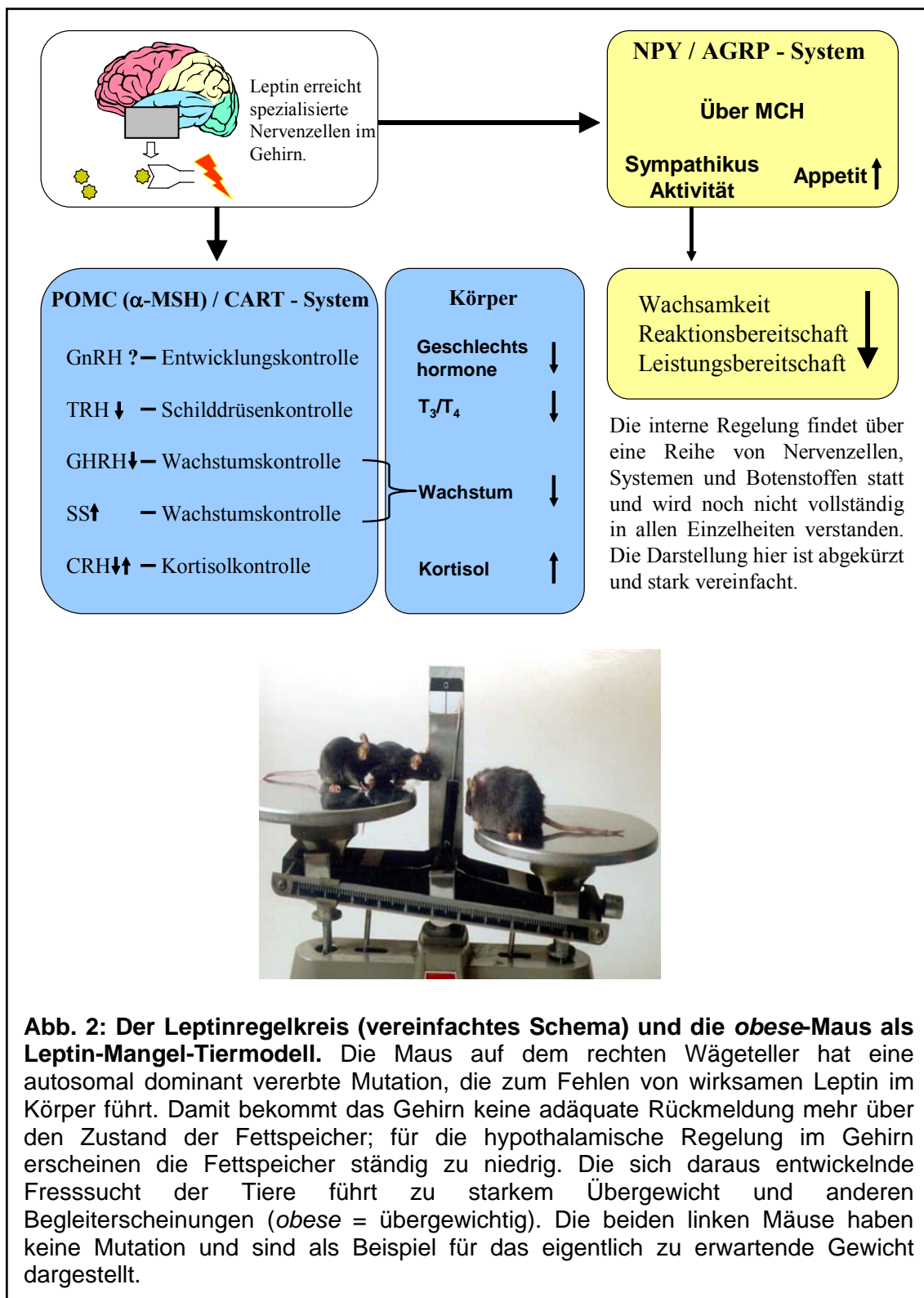
Aus evolutionstheoretischer Sicht ergab sich in Zeiten, in denen für Menschen die Gefahr von Hungersnöten bestand, ein Überlebensvorteil für Individuen, die in Zeiten des Nahrungsüberflusses Fettspeicher anlegen konnten. Es wird postuliert, dass dieser Mechanismus durch positive Selektion genetisch fixiert wurde als sogenannter „thrifty genotype“ (Neel *et al.*, 1998). Heutzutage steht aber ein Überfluss wohlschmeckender, hochkalorischer und günstiger Nahrung zur Verfügung, so dass die ehemals vorteilhafte Selektion dieses Genotyps ins Gegenteil verkehrt wird und gesundheitsschädliche Folgen mit sich bringt.

Es stellt sich die Frage, welcher Anteil des Körpergewichts genetisch determiniert ist und welcher Anteil aus Umwelteinflüssen resultiert. Zur Beantwortung dieser Frage wurden klassische genetische Untersuchungsmethoden angewandt: Es wurden Zwillingsforschung und Segregationsanalysen betrieben. Die Untersuchungen ergaben, dass eine starke genetische Komponente beim Phänotyp Körpergewicht vorliegt. Besonders hohe Schätzungen des Ausmaßes der Heritabilität ergaben sich aus

Zwillingsstudien, sie liegen zwischen 0,6 und 0,9 (Pietilainen *et al.*, 1999). Segregationsanalysen führten ebenfalls zu interessanten Ergebnissen; es fanden sich wiederholt Hinweise auf einen autosomal-rezessiven Hauptgeneffekt (Ziegler und Hebebrand, 1998). In einer untersuchten Familienpopulation erklärte dieses Hauptgen 35 % der Varianz des Gewichts, polygene Vererbung trug nach den Berechnungen zu 42 % der Körpergewichtsvarianz bei, und der verbleibende Anteil wurde auf Umwelteinflüsse zurückgeführt (Moll *et al.*, 1991).

II.1.7 Molekulargenetik der Adipositas

Nachdem also eine erbliche Komponente der Körpergewichtsregulation nicht von der Hand zu weisen ist, ist die Identifizierung der einzelnen beteiligten Gene notwendig. Die an der Gewichtsregulation beteiligten Regelkreise beim Menschen wurden vor allem an Nagetieren erforscht. Auch die Identifizierung monogener Adipositasformen beim Menschen erfolgte über das Tiermodell. Aufsehererregend war zum Beispiel die Entdeckung des Leptingens mit Hilfe des *obese*-Mausmodells. Diese Mäuse sind gekennzeichnet durch Adipositas, Hyperphagie, Hypothermie und Infertilität. Es konnte eine Mutation im *ob*-Gen (auch als Leptingen bekannt) identifiziert werden, die diesen Phänotyp bedingt (Zhang *et al.*, 1994). Die Klonierung dieses Gens führte zur Aufdeckung eines wichtigen Regelkreises. Dieser gestaltet sich vereinfacht folgendermaßen: Leptin wird aus Fettzellen in die Blutbahn sezerniert, gelangt zum Sättigungszentrum im Hypothalamus und wirkt dort über den Leptin-Neuropeptid-Y-Regelkreis appetithemmend (Abb. 2) (Considine *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1994; Halaas *et al.*, 1995). Die Relevanz dieses Regelkreises konnte auch beim Menschen gezeigt werden. Leptin wirkt sowohl an zentralen als auch an peripheren Rezeptoren und hat einen Einfluss auf Gewicht (Energieaufnahme und -verbrauch), Hämatopoese, Knochenbildung und Fortpflanzung (Friedmann *et al.*, 1998).



Des Weiteren konnten im Mausgenom sogenannte „quantitative trait loci“ analysiert werden, die an der oligo- und polygenen Vererbung der Adipositas beteiligt sind (Chagnon *et al.*, 2000). Dies gibt Anlass zur Suche nach homologen Genen beim Menschen.

Eine andere Methode zur Auffindung von an der Gewichtsregulation beteiligten Genen, sind die Genomscreens. Dabei wird hypothesenunabhängig nach relevanten Chromosomen-Regionen gesucht. Diese Suche erfolgt mit Hilfe einer großen Anzahl von Markern, die in engen Abständen auf den Chromosomen lokalisiert sind. Bei Feststellung eines Kopplungsbefundes zwischen der Chromosomenregion und Adipositas wird die Region auf ein Kandidatengen untersucht. Dabei werden wiederum aktuelle Hypothesen als Wahrscheinlichkeitskriterium mit einbezogen.

II.1.8 Syndromale Adipositas

Einen weiteren Anhaltspunkt zur Identifizierung von Genen liefern Formen der syndromalen Adipositas. Darunter versteht man eine Fettleibigkeit, die im Rahmen komplexer Regulationsstörungen auftritt und mit weiteren Symptomen zu verschiedenen Syndromen verknüpft ist. Diese Syndrome entstehen auf dem Boden von Mutationen in einzelnen (monogen) oder mehreren Genen, die mit Hilfe genetischer Methoden, wie Kopplungsanalysen und Expressionsstudien identifiziert werden können. Man unterscheidet autosomal-dominante, autosomal-rezessive und X-chromosomal gekoppelte Erkrankungen. Auch das Bardet-Biedl-Syndrom, das Gegenstand dieser Arbeit ist, gehört in den Formenkreis der syndromalen Adipositas. Tab. 3 gibt einen Eindruck über die Diversität dieser Störungen.

Die Identifikation von Genen, die an diesen komplexen Störungen beteiligt sind, bietet Anhaltspunkte für die Entdeckung neuer Regelkreise. Im weiteren Forschungsprozess kann dann analysiert werden, ob auch bei ansonsten gesunden adipösen Individuen eine Fehlfunktion im gefundenen Regelkreis vorliegt. Dies kann beispielsweise die Folge eines Heterozygoteneffekts sein, bei dem die Menge oder Aktivität eines Genprodukts eingeschränkt sein kann. Ist dies der Fall, kann geklärt werden, ob auf genetischer Ebene eine bekannte Mutation zugrunde liegt. Über Proteinstrukturen der Genprodukte und Homologievergleiche können eventuell neue Kandidatengene lokalisiert und untersucht werden. So bietet die Erforschung syndromaler Adipositas einen vielversprechenden Zugangsweg zur Aufklärung der Volkskrankheit Adipositas im Allgemeinen. Auch die Folgeerkrankungen der Adipositas können dann auf ihre Korrelation oder ihren Kausalzusammenhang mit diesen Regulationsstörungen hin untersucht werden.

Tab. 3: Auswahl monogener Störungen des Menschen, die mit syndromaler Adipositas einhergehen (Chagnon et al., 1999; Sheffield et al., 2001)

Erbgang	Syndrom	Locus	Kandidatengen
Autosomal-dominant	Achondroplasie (ACH)	4p16.3	FGFR3 (Fibroblastenwachstumsfaktor)
	Hereditäre Osteodystrophie Albright (AHO)	20q13.2	GNAS1 (Guanin-nukleotidbindendes Protein)
	Insulinresistenz-Syndrom	19p13.3	INSR (Insulinrezeptor)
	Familiäre partielle Lipodystrophie Dunningham (FPLD)	1q21-q22	LMNA/C (Laminin A/C)
	Prader-Willi-Syndrom	15q11-q13	SNRPN
	Ulnar-mammary-(Schinzel)-Syndrom (UMS)	12q23-24	TBX3 (T-Box 3-Protein)
	Alstrom-Syndrom (ALMS1)	2p13-p12	
Autosomal-reszessiv	Bardet-Biedl-Syndrom 1-9 (BBS1-9)	s.u.	s.u.
	Fanconi-Bickel-Syndrom (FBS)	3q26	SLC2A
X-gekoppelt	Borjeson-Forssman-Lehmann-Syndrom (BFLS)	Xq26.3	FGF13 (Fibroblastenwachstumsfaktor)
	Mehmo-Syndrom (MEHMIO)	Xp22.13	
	Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom 1 (SGBS-1)	Xq26	GPC3, GPC4 (Glypican 3 und 4)
	Wilson-Turner-Syndrom (WTS)	Xp21.1-q22	

II.2 Das Bardet-Biedl-Syndrom

II.2.1 Klinische Erscheinungsform und Definition

Das Bardet-Biedl-Syndrom ist eine multisystemische Erkrankung, die folgende Kardinalsymptome aufweist (in Klammern ist die Häufigkeit angegeben, mit der das jeweilige Symptom bei BBS-Patienten gefunden wird) (Beales *et al.*, 1999):

- atypische Retinitis pigmentosa (93 %)
- Nephropathien (90 %)
- Polydaktylie (69 - 90 %)
- Adipositas (72 - 90 %)
- Hypogonadismus im männlichen Geschlecht (90 %)
- mentale Retardierung (60 %)

Außerdem sind folgende Sekundärkriterien erhoben worden (Beales *et al.*, 1999):

- Sprachbehinderung
- Katarakt/Astigmatismus/Strabismus
- Brachydaktylie/Syndaktylie
- Entwicklungsverzögerung
- Polyurie/Polydipsie
- Ataxie/Gleichgewichts- und Koordinationsstörungen
- leichte Spastizität (v. a. untere Extremitäten)
- Diabetes mellitus
- Störungen der Zahnentwicklung
- Hypertrophie des linken Ventrikels/kongenitale Herzerkrankung
- Leberfibrose

Die Diagnose Bardet-Biedl-Syndrom ist zu stellen, wenn entweder vier der Hauptkriterien oder drei der Hauptkriterien und zwei der Nebenkriterien erfüllt sind.

Zu den Hauptsymptomen sind noch einige Spezifikationen notwendig:

Atypische Retinadystrophie: Bei dieser Erkrankung kommt es zur progressiven, unbeeinflussbar fortschreitenden Degeneration der Photorezeptoren und damit zur zunehmenden Sehverschlechterung, die letztendlich in die Blindheit mündet. Im Alter von 30 Jahren sind i.d.R. alle BBS-Patienten amaurotisch, die Nachtblindheit setzt früher ein (Abb. 3) (Cox *et al.*, 2003; Beales *et al.*, 1999; Castle *et al.*, 1993).

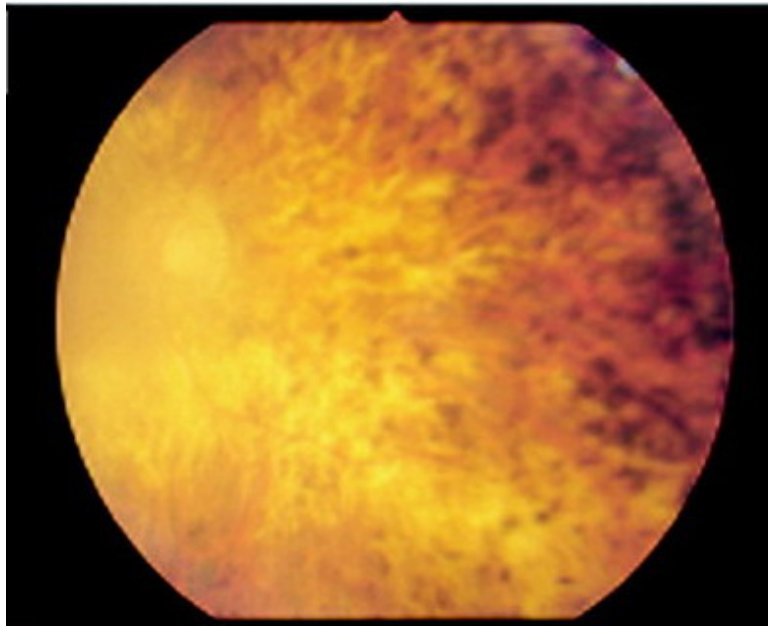


Abb. 3: Klinische Merkmale bei Bardet-Biedl-Syndrom-Patienten I. Die Fundoskopie zeigt eine atypische Retinadegeneration (Katsanis *et al.*, 2001). In den peripheren Fundusbereichen kommt es zur Aggregation schwarzen Pigments.

Nephropathien: Die Nierenerkrankungen sind klinisch besonders relevant; sie stellen die häufigste Todesursache der BBS-Patienten dar. 25 % der Patienten versterben vor dem 43. Lebensjahr (Bruhl *et al.*, 2001; O'Dea *et al.*, 1996). Es finden sich u.a. eine chronische Glomerulonephritis, Zystennieren, Missbildungen der ableitenden Harnwege mit vesikoureteralem Reflux und Defekten der tubulären Konzentrationsfähigkeit (Beales *et al.*, 1997). Als Folgen dieser Erkrankungen können renale Hypertonie, progrediente Niereninsuffizienz und konsekutive Dialysepflichtigkeit auftreten. Besonders zu beachten ist, dass auch bei heterozygoten Trägern einer Mutation in einem der *BBS*-Gene (s.u.), die ansonsten keine Symptome des Bardet-Biedl-Syndroms aufweisen, eine erhöhte Prävalenz für renale Malformationen und klarzellige Nierenkarzinome besteht (Abb. 4) (Beales *et al.*, 1999).

Polydaktylie: Am häufigsten findet sich eine postaxiale Hexadaktylie (David *et al.*, 1999; Beales *et al.*, 1997), zuweilen auch Brachydaktylie, selten Syndaktylie (Abb. 5) (Beales *et al.*, 1999).

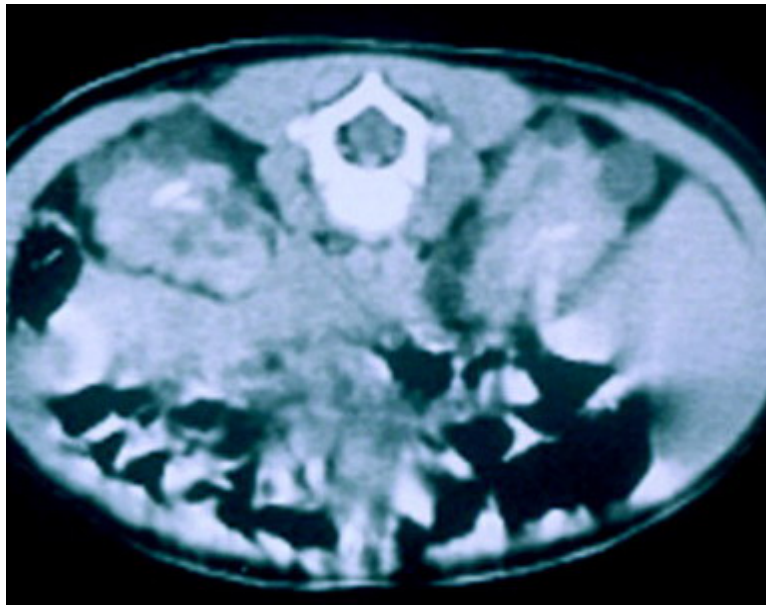


Abb. 4: Klinische Merkmale bei Bardet-Biedl-Syndrom-Patienten II. Die CT-Aufnahme der Nieren zeigt eine polyzystische Degeneration (Katsanis *et al.*, 2001).



Abb. 5: Klinische Merkmale bei Bardet-Biedl-Syndrom-Patienten III. An Händen und Füßen dieses Patienten findet sich eine Polydaktylie; es handelt sich beim Bardet-Biedl-Syndrom meist um eine postaxiale Polydaktylie (Katsanis *et al.*, 2001).

Adipositas: Während Neugeborene und Säuglinge mit BBS zumeist noch normalgewichtig sind, ist bei ihnen ab dem zweiten bis dritten Lebensjahr eine überproportionale Gewichtszunahme zu verzeichnen. Diese wird im Wesentlichen durch Hyperphagie bedingt. Der durchschnittliche BMI liegt bei erwachsenen männlichen Patienten bei $31,5 \text{ kg/m}^2$ und bei weiblichen bei $36,6 \text{ kg/m}^2$ (Beales *et al.*, 1999). Über die Prädisposition zur Adipositas bei Verwandten der BBS-Patienten, die ansonsten keine Symptome aufweisen, liegen unterschiedliche Angaben vor. Während

eine Schätzung (Croft *et al.*, 1995) davon ausgeht, dass sogar 2,9 % der adipösen männlichen Bevölkerung ein mutiertes BBS-Gen trägt, konnte in anderen Studien keine erhöhte Prävalenz gegenüber der Allgemeinbevölkerung gezeigt werden (Abb. 6) (Beales *et al.*, 1999).



Abb. 6: Klinische Merkmale bei Bardet-Biedl-Syndrom-Patienten IV. Die Patienten sind übergewichtig bzw. adipös (Katsanis *et al.*, 2001).

Hypogonadismus und Infertilität:

Von diesem Aspekt des Bardet-Biedl-Syndroms sind vor allem die männlichen Patienten betroffen. Es finden sich ein Malescensus testis, ein hypoplastisches Skrotum und ein Mikropenis und daraus resultierende Infertilität. Bei weiblichen Patienten gibt es ebenfalls kongenitale Fehlbildungen, aber nicht so häufig. Es wurden Vaginalatresie, Hydrometrokolpos, Uterus duplex und Septierungen der Vagina beschrieben (Abb. 7). Annähernd alle Frauen haben Zyklusstörungen (David *et al.*, 1999; Devarajan *et al.*, 1995). BBS-Patientinnen sind nicht notwendigerweise infertil, und einige haben gesunde Kinder zur Welt gebracht.

Mentale Retardierung: Die Frage einer Intelligenzminderung der BBS-Patienten muss differenziert betrachtet werden. Der durchschnittliche IQ liegt bei 80-90 (Green *et al.*, 1989; Riise *et al.*, 1997) und ist damit nur leicht unterdurchschnittlich. Etwa die Hälfte der Kinder besuchen Sonderschulen. Es gibt aber vereinzelt Fälle, in denen Patienten

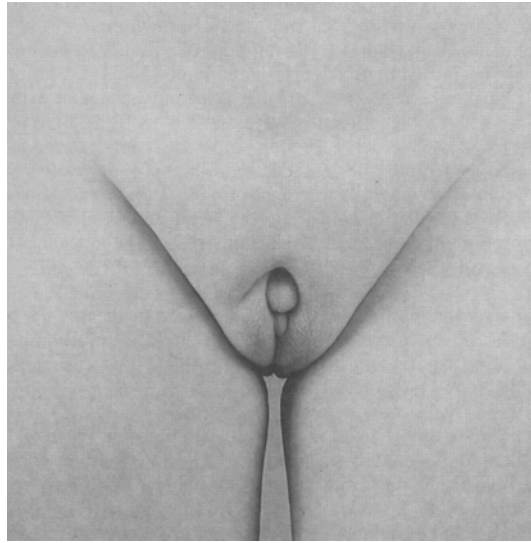


Abb. 7: Klinische Merkmale bei Bardet-Biedl-Syndrom-Patienten V.
Hypogenitalismus beim Knaben mit BBS-Syndrom (Katsanis *et al.*, 2001).

sogar einen Hochschulabschluss erlangt haben. Gehäuft tritt bei Patienten ein Talent für arithmetische Mathematik auf. Außerdem ist fest zu stellen, dass das Langzeitgedächtnis meist deutlich besser ist als das Kurzzeitgedächtnis (Beales *et al.*, 1999). Die vormalig niedrigere Einschätzung der geistigen Fähigkeiten ist u. a. darauf zurück zu führen, dass die Sehbehinderung bei Intelligenztests nicht berücksichtigt wurde.

II.2.2 Epidemiologische Daten zum Bardet-Biedl-Syndrom

Die Prävalenzraten des Bardet-Biedl-Syndroms sind weltweit sehr unterschiedlich verteilt. In kaukasischen Populationen ist das Syndrom mit einer Häufigkeit von 1 : 140.000 - 160.000 in Nordamerika und Europa relativ selten (Croft *et al.*, 1995; Klein *et al.*, 1969). Die höchsten Raten in Europa finden sich in Dänemark mit 1 : 59.000 (Bruhl *et al.*, 2001). Für Deutschland liegen keine Zahlen vor.

In der isolierten Neufundlandpopulation gibt es eine deutlich höhere Prävalenzrate mit 1:16.000 (Woods *et al.*, 1999). Dies ist unter anderem auf Gründereffekte zurück zu führen. Besonders hoch ist die Prävalenz auch bei den kuwaitischen Beduinenvölkern mit 1 : 13.500, was wahrscheinlich mit dem hohen Grad der Blutsverwandtschaft (87 %) korreliert (Woods *et al.*, 1999).

II.2.3 Die genetischen Grundlagen des Bardet-Biedl-Syndroms

II.2.3.1 Die verschiedenen BBS-Gene

Lange Zeit galt BBS als klassisches autosomal-rezessiv vererbtes Syndrom. Diese Vermutung erwies sich aber als unzureichend. Es wurden mit Hilfe von Kopplungsanalysen und mittlerweile auch durch die gezielte Suche nach bestimmten Sequenzen mindestens 10 BBS-Gene postuliert, von denen neun lokalisiert und kloniert wurden (Tab. 4).

Tab. 4: Die *BBS*-Gene und ihre Lokalisation im Überblick.

Name des Gens	Position	Quelle
<i>BBS1</i>	11q13	Mykytyn <i>et al.</i> , 2003
<i>BBS2</i>	16q21	Nishimura <i>et al.</i> , 2001
<i>BBS3</i>	17q12	Chiang <i>et al.</i> , 2004 Fan <i>et al.</i> , 2004
<i>BBS4</i>	15q23	Mykytyn <i>et al.</i> , 2001
<i>BBS5</i>	2q31	Li <i>et al.</i> , 2004
<i>BBS6</i>	20p12	Kim <i>et al.</i> , 2004; Slavotinek <i>et al.</i> , 2000
<i>BBS7</i>	4q32	Badano <i>et al.</i> , 2003
<i>BBS8</i>	14q31	Ansley <i>et al.</i> , 2003
<i>BBS9</i>	7p14	Darryl <i>et al.</i> , 2005

Es muss mindestens ein weiterer Locus postuliert werden, da bei zahlreichen Patienten durch Haplotyp-Analysen ausgeschlossen werden konnte, dass sie eine Mutation in einem der neun bekannten Loci tragen (Katsanis *et al.*, 2004).

Eine Mutation im *BBS1*-Gen wird bei den BBS-Patienten am häufigsten diagnostiziert, allerdings auch nur in 20-25 % der kaukasischen Fälle. Abb. 8 kann man die Daten für die Häufigkeit entnehmen, mit der eines der Gene beim BBS-Syndrom mutiert ist. Sie verdeutlicht auch, dass es noch mindestens ein weiteres BBS-Gen geben muss. Wahrscheinlicher ist, dass es noch mehrere weitere Gene gibt, die jeweils zu einem gewissen Prozentsatz zur Entstehung des Bardet-Biedl-Syndroms beitragen.

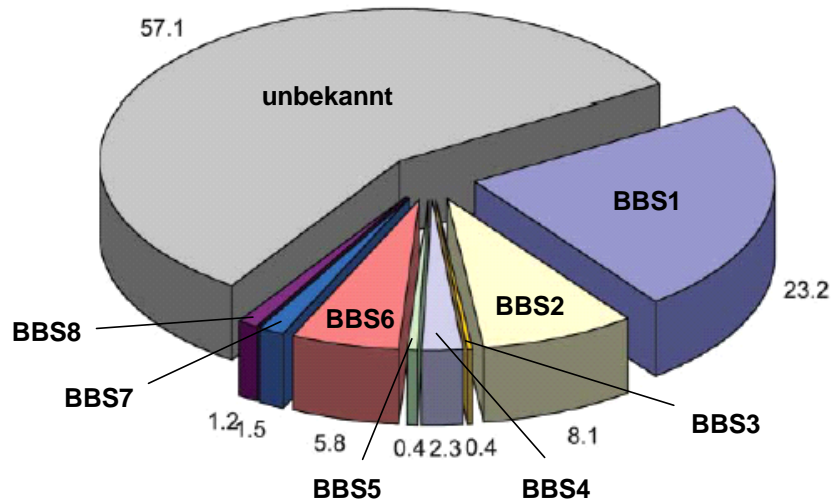


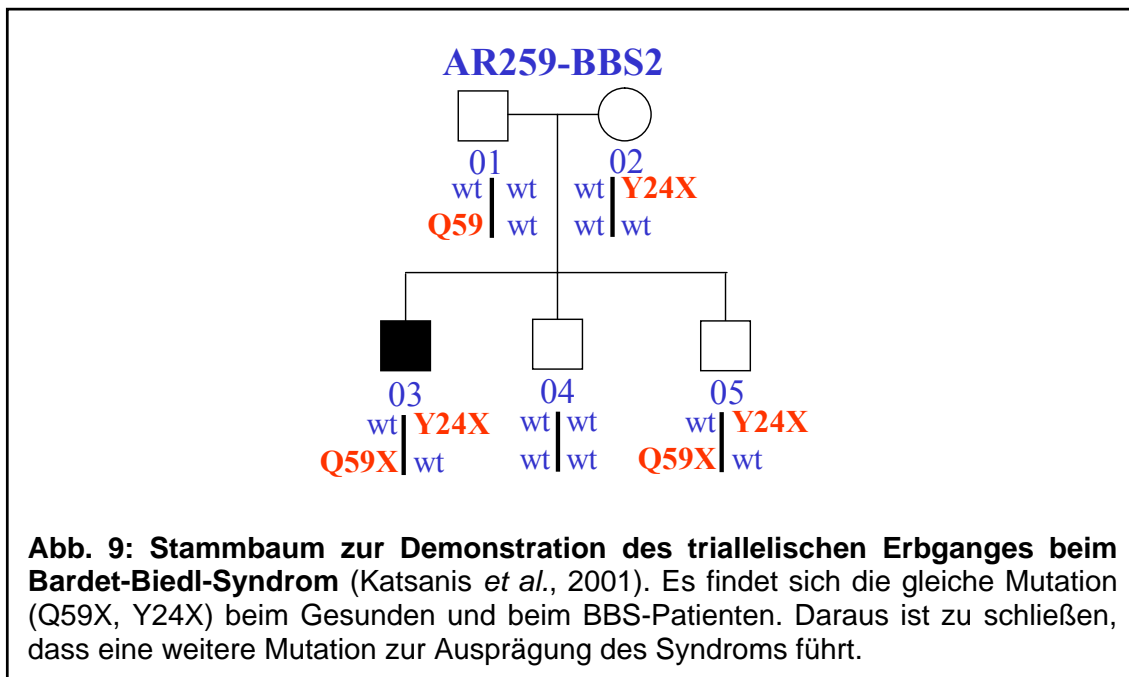
Abb. 8: Prozentuale Anteil der für das Bardet-Biedl-Syndrom verantwortlichen Gene. Daten für *BBS9* liegen noch nicht vor (Katsanis *et al.*, 2004).

II.2.3.2 Genetische Modifikationen und triallelische Vererbung beim Bardet-Biedl-Syndrom

Durch eine Mutation in jedem der aufgeführten Gene kann es zur Ausbildung des Bardet-Biedl-Syndroms kommen. Da die Ausprägung, Art und Lokalisation der Symptome sehr variabel ist und außerdem manche Symptome konnatal, andere erst im Verlauf der weiteren Entwicklung auftreten, kamen Zweifel an einem einfachen autosomal-rezessiven Erbgang auf.

Es stellte sich heraus, dass manche Patienten für eine BBS-Mutation heterozygot waren, gleichzeitig waren Verwandte, die die gleiche Mutation heterozygot trugen, gesund (Katsanis *et al.*, 2000; Slavotinek *et al.*, 2000). Dies führte zur Vermutung, dass bei den kranken Individuen eine weitere Mutation vorliegen müsse, die über eine Interaktion mit dem anderen gefundenen mutierten Gen zur Ausprägung des Syndroms führt. Die Vermutung konnte bei einigen Patienten bestätigt werden, so dass für das Bardet-Biedl-Syndrom ein sogenannter triallelischer Erbgang postuliert wurde (Abb. 9) (Katsanis *et al.*, 2001).

Dieser triallelische Erbgang konnte bisher für alle *BBS*-Gene gezeigt werden, besonders häufig sind *BBS4* und *BBS6* involviert, am seltensten *BBS1*. Das Modell wurde weiter



dadurch verfeinert, dass festgestellt wurde, dass auch Penetranz und Expressivität der Gene durch Mutationen in anderen BBS-Genen beeinflusst werden können. Es zeigte sich, dass bestimmte Genkombinationen besonders fatale Konsequenzen für den Krankheitsverlauf haben. Diese Beobachtung ist auch im Kontext zu *in vitro*-Studien an HeLa-Zellen zu bewerten; dort fand man ebenfalls besonders starke Effekte bei bestimmten Mutationskombinationen (Katsanis *et al.*, 2004).

Insgesamt ist also für das Bardet-Biedl-Syndrom eine Koexistenz des autosomal-rezessiven und des triallelischen Erbgangs zu fordern.

II.2.3.3 Die verschiedenen BBS-Proteine

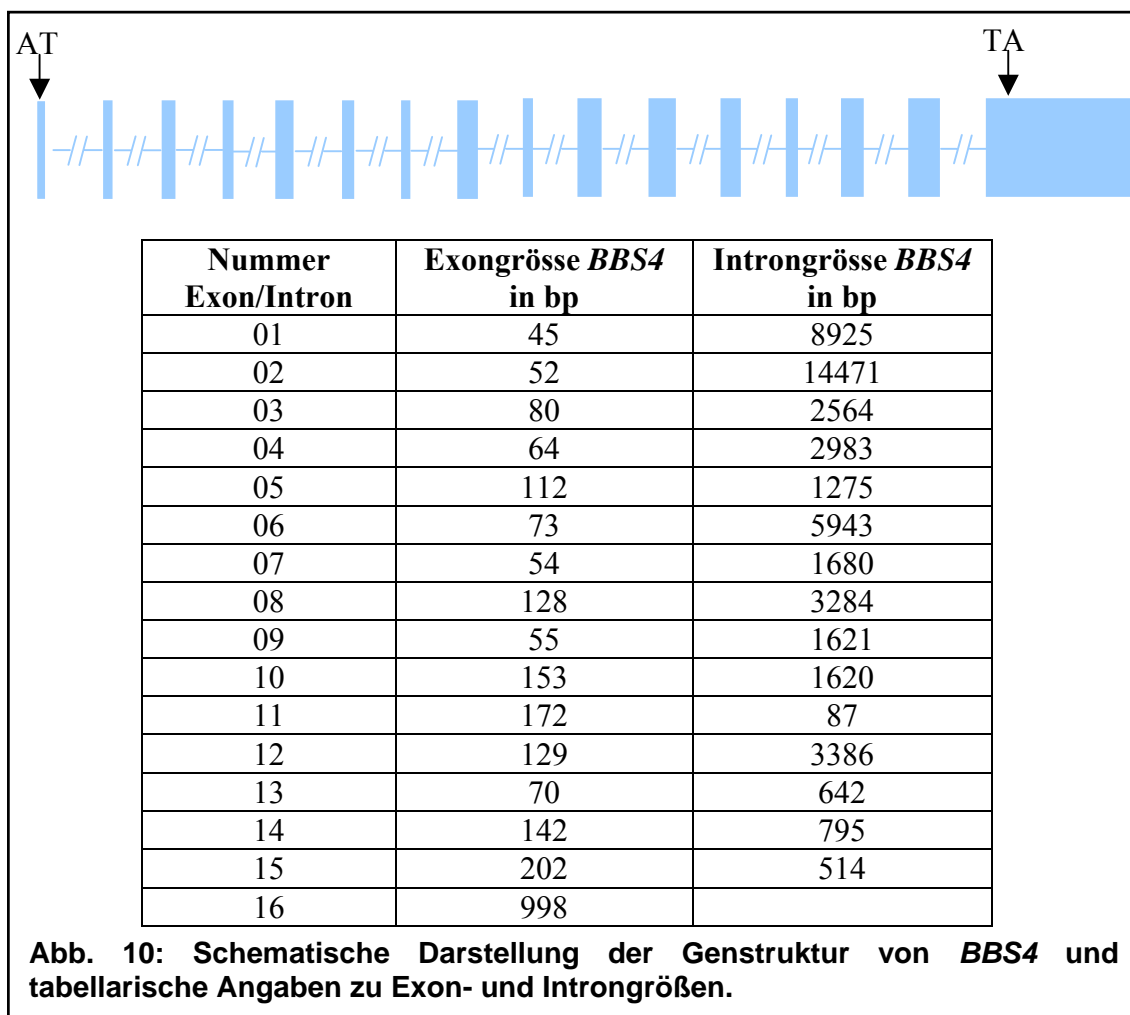
Seit 2003 sind immense Fortschritte in der Erforschung der Ätiopathogenese des Bardet-Biedl-Syndroms auf zellulärer Ebene gemacht worden. Insbesondere die Rolle der einzelnen Proteine in der Organisation des Zytoskeletts und der Zellmotilität wurde intensiv erforscht. Dies führte auch jüngst durch eine Kombination aus „herkömmlichen genetischen Methoden“ und Orthologievergleichen von Proteinen in Zytoskelettstrukturen in verschiedenen Organismen zur Identifikation der Gene BBS5, 7 und 8 (Li *et al.*, 2004, Badano *et al.*, 2003, Beales *et al.*, 2005). Insgesamt zeigt sich, dass die BBS-Proteine wesentlich in der Organisation der Zellpolarität (Katsanis *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2004) beteiligt sind. Außerdem tragen sie zur Ausbildung von Zilien

und Flagellen bei und (Li *et al.*, 2004) sind wahrscheinlich im vesikulären intrazellulären Proteintransport entlang von Mikrotubulistrukturen involviert (Kim *et al.*, 2004). Damit wird erstmals eine so komplexe Erkrankung wie das Bardet-Biedl-Syndrom auf eine Störung im Aufbau und in der Dynamik des Zytoskeletts zurückgeführt. Diese Ergebnisse stellen die Basis für zahlreiche weitere Untersuchungen dar, in denen geklärt werden muss, an welcher Stelle die zellulären Abläufe und Signalkaskaden durch eine Mutation der *BBS*-Gene gestört sind, und wie dies zur Ausprägung der klinischen Symptome führt. Zur Übersicht sind in Tab. 5 die BBS-Proteine und ihre Funktion - soweit bekannt - dargestellt.

Tab. 5: Die BBS-Proteine und ihre Lokalisation im Überblick.				
Name des Proteins	Mögliche Protein-funktion	mögliche Protein-domänen	zelluläre Lokalisation	Quelle
BBS1	unbekannt	beta-Propeller	unbekannt	Mykytyn <i>et al.</i> , 2003
BBS2	unbekannt	beta-Propeller	unbekannt	Nishimura <i>et al.</i> , 2001
BBS3	ADP-Ribosylierung	unbekannt	Intraflagellarer Transport	Chiang <i>et al.</i> , 2004 Fan <i>et al.</i> , 2004
BBS4	Perizentrioläre Organisation	TPR (Tetratricopeptid)	perizentriolär	Mykytyn <i>et al.</i> , 2001
BBS5	Zilien- und Flagellen-Organisation	unbekannt	Basalkörper	Li <i>et al.</i> , 2004
BBS6	Chaperon	unbekannt	perizentriolär	Kim <i>et al.</i> , 2004; Slavotinek <i>et al.</i> , 2000
BBS7	unbekannt	Beta-Propeller	unbekannt	Badano <i>et al.</i> , 2003
BBS8	unbekannt	TPR	perizentriolär	Ansley <i>et al.</i> , 2003
BBS9	Parathormon-Antwort	unbekannt	unbekannt	Darryl <i>et al.</i> , 2005

II.2.4 BBS4: Gen und Protein

BBS4 kann als eines der am besten charakterisierten BBS-Gene gelten. Es ist lokalisiert auf Chromosom 15, genauer gesagt liegt es in der Region 15q22.3-q23. Der Leserahmen für *BBS4* setzt sich aus 519 Codons zusammen, die auf 16 Exons verteilt sind (Abb. 10).



Es konnte gezeigt werden, dass *BBS4* an der triallelischen Vererbung beteiligt ist, insbesondere im Zusammenspiel mit Mutationen in den Genen *BBS2* und *BBS1*, nicht aber mit einem der anderen BBS-Gene.

Bisher sind folgende vier verschiedenen Mutationen im *BBS4*-Gen identifiziert worden.

1. *ARG295PRO*: In einer Beduinen-Population konnte eine Mutation dargestellt werden, die, wenn sie homozygot vorliegt, zum Bardet-Biedl-Syndrom führt. Es

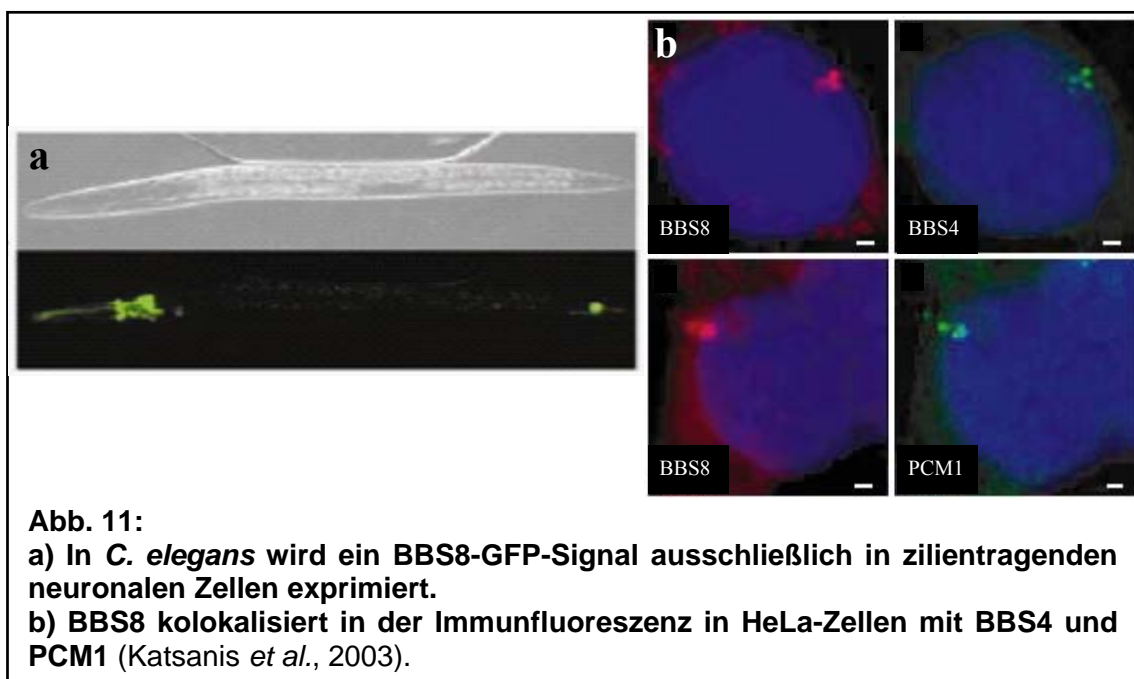
handelt sich um eine G-C-Punktmutation in Exon 12, die zu einer Codierung von Prolin statt Arginin im Codon 295 führt (Carmi *et al.*, 1995).

2. *EX3-4 DEL*: Des Weiteren wurde eine Deletion bei BBS-Patienten gefunden, die die Exons 3 und 4 betrifft, die Bruchstellen finden sich in Alu-Repeats der angrenzenden Introns (Mykytyn *et al.*, 2001).
3. *IVS3-2 A->G*: In einer blutsverwandten Saudi-Arabischen Familie wurde eine homozygote Mutation in einer Spleiß-Akzeptor-Sequenz gefunden, dort ist A zu G in Exon 4 mutiert (Katsanis *et al.*, 2001). Diese Mutation führt möglicherweise zu fehlerhaftem Spleißen und anschließendem RNA-Abbau.
4. *ALA364GLU*: In diesem Fall fand sich in kuwaitischen BBS4-Patienten eine Mutation von C nach A an Position 1091. Daraus resultiert ein Austausch von Alanin durch Glutamat an der Aminosäurenposition 364 (Katsanis *et al.*, 2001).

Über die Struktur und Funktion des Proteins, das von *BBS4* codiert wird, sind einige Informationen verfügbar. Es konnte gezeigt werden, dass BBS4 sogenannte TPR-Motive enthält und zwar mindestens zehn. Eine solche TPR-Domäne setzt sich typischerweise aus 34 Aminosäuren zusammen:

[WLF]-X(2)-[LIM]-[GAS]-X(2)-[YLF]-X(8)-[ASE]-X(3)-[FYI]-X(2)-[ASL]-X(4)-[PKE] ist die Konsensussequenz. Das Motiv ist stark konserviert und findet sich bei *S. cerevisiae*, Pilzen, Pflanzen und auch beim Menschen. Es spielt eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen, aber die genaue Struktur von Interaktionspartnern konnte noch nicht identifiziert werden. Proteine mit diesem Motiv sind in verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert. Sie spielen eine Rolle im Zellzyklus, in mitochondrialen Transportsystemen, bei der Transkription und weiteren zellulären Prozessen. Aus 5-6 Tandem-Repeats des TPR-Motivs kann sich eine rechtsdrehende helikale amphipathische Sekundärstruktur bilden. Zur Familie der Proteine mit TPR-Motiven gehört auch die O-Glucosamin-N-Acetyl-Transferase (OGT). Es ist gezeigt worden, dass BBS4 eine starke Homologie zu diesem Enzym aufweist (Mykytyn *et al.*, 2001). In *Arabidopsis* spielt die Transferase eine Rolle in der Entwicklung. Beim Menschen ist sie mit dem Zuckerstoffwechsel und der Genese von Diabetes mellitus in Verbindung gebracht worden.

Mittlerweile konnte auch die Lokalisation von BBS4 in der Zelle dargestellt werden. Das durch Immunfluoreszenz sichtbar gemachte Genprodukt kolokalisiert mit perizentriolärem Material in den Basalkörpern und Zentrosomen. (Rosenbaum *et al.*, 2002). Das *C. elegans*-Homolog zu BBS8, das wiederum über Homologieuntersuchungen mit BBS4 gefunden wurde, wurde nur in zilientragenden Zellen von *C. elegans* nachgewiesen (Abb. 11a). *C. elegans* gilt als Modellorganismus für Ziliogenese und intraflagellaren Transport (IFT) (Rosenbaum *et al.*, 2002). Auch für andere BBS-Proteine konnte dieses Lokalisationsmuster in zilientragenden Zellen gezeigt werden (Katsanis *et al.*, 2003). BBS4 und BBS8 besitzen zudem einen gemeinsamen Interaktionspartner: PCM1, ein Protein, das in die Replikation des Zentriols während der Ziliogenese involviert ist (Abb. 11b) (Katsanis *et al.*, 2003; Dammermann *et al.*, 2002; Kubo *et al.*, 1999). Mutationen in *BBS4* können zur Mislokalisierung von PCM1 führen (Katsanis *et al.*, 2003). Aus der Gesamtheit dieser Beobachtungen ergibt sich die Vermutung, dass BBS4 eine wesentliche Rolle im Strukturstoffwechsel der zilientragenden Zellen spielt.



In Mauszellen konnte das entsprechende BBS8-Ortholog mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers detektiert werden. Es wurde gefunden in Spermatiden, in der Retina, in bronchialen Epithelzellen und in den ependymalen Zellen des Telencephalons. Alle genannten Gewebe sind zilientragend, so dass scheinbar auch in Mammalia eine

Expression der BBS-Proteine 4 und 8 präferentiell in diesen Zellen stattfindet (Abb. 12) (Katsanis *et al.*, 2003).



Die zuletzt entdeckten Gene *BBS5* und *BBS3* codieren ebenfalls für Proteine, die an der Organisation des Zilien- und Flagellenapparats, sowie am filamentären Stoffwechsel beteiligt sind.

II.3 Ziele dieser Arbeit

II.3.1 Proteininteraktionen der BBS-Proteine

Angeichts der vorangehend dargestellten Erkenntnisse ergab sich für die vorliegende Arbeit die Frage nach potentiellen Interaktionen der einzelnen BBS-Proteine untereinander. Die gemeinsame Lokalisation der Proteine in den zilientragenden Zellen könnte ein Hinweis auf ihre dortige Interaktion sein. Möglicherweise lässt sich auch das beobachtete Phänomen der gegenseitigen Beeinflussung von nebeneinander vorliegenden BBS-Mutationen auf Proteinebene klären. Weiterhin sollte geklärt werden, mit welchen weiteren Proteinen aus dem menschlichen Organismus BBS-Proteine interagieren können.

In dieser Arbeit sollte letztere Frage für das Protein BBS4 untersucht werden. Es erscheint als besonders geeignet, da erste Hinweise auf seine Funktion als N-Acetyl-Glucosamin-Transferase vorliegen und BBS4 das TPR-Motiv enthält. Diese beiden Eigenschaften lassen vermuten, dass BBS4 als Interaktionspartner für andere Proteine in Frage kommt.

Als Methode zur Aufklärung der potentiellen Interaktionen wurde das Yeast-Two-Hybrid-System gewählt. *S.cerevisiae* dient dabei als eukaryotischer Modellorganismus, der die Bedingungen zur Interaktion von Proteinen zur Verfügung stellt und ihre Detektion ermöglicht.

Die Beantwortung der aufgeworfenen Fragen in dieser Doktorarbeit sollte also zu neuen Einblicken in die molekularen Grundlagen und die Ätiopathogenese des komplexen Bardet-Biedl-Syndroms führen.

III Materialien

III.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Elektrophorese	Gelelektrophoresekammern (horizontal) (AGS, Heidelberg, Gibco, BRL, USA, MWG-Biotech, München)
Heizblock	Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg)
Inkubatoren	
- Bakterien	Typ B 5042E und T 5050 (Heraeus, Hanau)
- Hefe	Typ B 5042E (Heraeus, Hanau)
DNA-Sequenzierung	DNA-Sequenzierer, Modell 310 und Modell 377 (Applied Biosystems, Darmstadt)
Netzgeräte	EPS 500/400 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) LKB ECPS 3000/150 (Gibco, BRL, USA) GPS 200/400 (Gibco, BRL, USA) PS 9009 (Gibco, BRL, USA)
Plastikgefäße	Eppendorf Safe-Lock Reaktionsgefäße, 0.5, 1,5, 2 ml (Hamburg) MBB 72100 Tubes (Fa. Greiner Bio-One, Nürtingen) Nuncclon TM Surface 96-well (Nunc TM Brand Products, Wiesbaden) Petrischale 145/20 OG/Mn (Greiner Bio-one, Nürtingen) Petrischale 92x16mm mit Nocken (Sarstedt & Co, Nümbrecht) PP-Test-Tubes, sterile, 15 und 50 ml (Greiner Bio-One, Nürtingen)
Zentrifugen	Kühlzentrifuge Sorvall RT 6000 (Du Pont, Dreieich)

	Eppendorf-Zentrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg)
	Eppendorf-Zentrifuge 5417 C (Eppendorf, Hamburg)
	Sorvall RT 6000B (Du Pont, Dreieich)
PCR	Thermocycler, GeneAmp PCR System 2400 und 9600 (Perkin Elmer Cetus, USA)
	Biometra-TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen)
Sonstige	Autoklav (Grössner, Hamburg)
	Corex – Glasgefäße (Dupont Instruments, Dreieich)
	Elektroporationssystem EasyjecT Plus (Peqlab, Erlangen)
	Glassperlen 710-1180 microns, washed (Sigma, Deisenhofen)
	Magnetrührer Modell IKAMAG RH (Fa. IKA Labortechnik, Staufen)
	Mikrowelle (Bosch)
	Milli-Q water system (Millipore, Eschborn)
	pH-Meter Modell CG 840 (Schott, Hofheim a. Ts)
	Photometer, GeneQuant II, Novospec II (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
	Pipetten (Eppendorf, Hamburg; Gilson, Den Haag)
	Sterilbank Lamin Air Flow HA 2448GS (Heraeus, Hanau)
	Sterilfilter (0,2 µ Porengröße) (Schleicher, Schüll, Dassel)
	Trans-Blot Semi-Dry-Transfer-Cell (BioRad, München)
	Ultrospec 300 (Pharmacia Biotech, Freiburg)
	UV-Transilluminator mit Videokamera, Bildschirm UVT2035 (302 nm)
	Transilluminator UVT-40 M (Herolab, St. Leon Rot, Wiesloch)
	Dokumentationssystem E.A.S.Y. RH-3 (Herolab, St. Leon Rot, Wiesloch)
	Vortex REAX 1DR (Heidolph, Hamburg)
	Waage Modell AE 240 und PM 2000 (Mettler, Gießen, Schweiz)
	Präzisionswaage Modell 2116 (Sartorius-Werke, Göttingen)
	Wasserbad GFL 1086 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
	Kühlwasserbad Julabo F10 (Julabo, Seelbach)

III.2 Chemikalien

Acrylamidlösung (30 %)	Roth (Karlsruhe)
Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Life technologies (Karlsruhe)
Aminosäuren, einzeln oder mehrere	Sigma (Deisenhofen)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Ratiopharm (Ulm)
APS	Merck (Darmstadt)
Beta-Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
DMF	Merck (Darmstadt)
DNA-Molekulargewichtsstandard:	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
dNTPs	MBI Fermentas (St.Leon-Rot)
DTT	Merck (Darmstadt)
ECL	Amersham Pharmacia (Freiburg)
EDTA	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ficoll (Typ 400)	Sigma Chemical Company (UK)
Formamid	Merck (Darmstadt)
Glucose	Merck (Darmstadt)
Hefeextrakt	Invitrogen (Groningen)
Kanamycin	Sigma (Deisenhofen)
Long Ranger Gel Solution	Biozym (Hess. Oldendorf)
ONPG	Sigma (Deisenhofen)
PEG	Merck (Darmstadt)
Phenol-Chloroform	Roth (Karlsruhe)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma (Deisenhofen)
Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa	MBI Fermentas (St. Leon Roth)
SDS	Serva

Temed	Serva
Tween20	Merck (Darmstadt)
X-Gal	Serva
Xylencyanol	Merck (Darmstadt)

Alle übrigen Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad von folgenden Firmen bezogen:

Boehringer Mannheim (Mannheim), Difco (Detroit,USA), Invitrogen (Eggenstein)
Merck (Darmstadt), Messer Griesheim (Düsseldorf), Amersham Pharmacia (Freiburg),
Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen)

III.3 Basis-Lösungen

PBS (phosphate buffered saline):

6,5 mM	Na_2HPO_4
1,5 mM	KH_2PO_4
2,5 mM	KCl
140 mM	NaCl → auf pH 7,25 einstellen

TE (Tris-EDTA)-Puffer:

10 mM	Tris-Base
1 mM	EDTA → auf pH 7,5 einstellen

Gelladepuffer (für Agarosegele):

25 %	Ficoll
0,25 %	Xylencyanol FF (läuft bei 700 bp)
0,25 %	Bromphenolblau (läuft bei 600 bp)
3 mM	EDTA

SDS-Probenpuffer (3x):

1,8 g	Tris
30 ml	Glycerin
7,2 g	SDS, Mischung → auf pH 6,8 einstellen
15 ml	β-Mercaptoethanol (jeweils frisch)
0,06 %	Bromphenol
ad 100 ml	

TBE-Puffer (5 x):

5 M	Tris-HCL, pH 8,3
0,45 M	Borsäure
100 mM	EDTA

50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA):

242 g	Tris-Base
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA pH 8
ad 1 l	→ auf pH 8,5 einstellen

Ampicillinlösung: 100 mg/ml → 1 µl/1 ml verdünnt eingesetzt

Kanamycinlösung: 30 mg/ml → 6,6 µl/1 ml verdünnt eingesetzt

III.4 Medien

III.4.1 Bakterienmedien

LB-Medium: (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g	Peptone
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl
ad 1000 ml	A. dest. → wird autoklaviert

SOB-Medium:

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
2,46 g MgSO_4
2 ml NaCl (5M)
10 ml MgCl_2 (1M)
ad 1000 ml A. dest. → wird filtersterilisiert

SOC-Medium:

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
0,5 g NaCl
10 ml 0,25 M KCl
5 ml 2 M MgCl_2
20 ml 1 M Glucose
ad 1000 ml A. dest. → pH mit NaOH auf 7,0
→ autoklavieren

TB-Medium:

12 g Trypton
24 g Hefeextrakt
4 ml Glycerin
ad 900 ml A. dest. → autoklavieren

Vor Gebrauch: 100 ml einer sterilen KH_2PO_4 -Lösung zugeben (0,17 M KH_2PO_4 +0,72 M K_2HPO_4)

Zur Herstellung von Festmedien wurde dem entsprechenden Flüssigmedium vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Agar zugesetzt.

III.4.2 Hefemedien:

YPD-Medium

20 g Pepton
10 g Hefeextrakt
10 g Glucose

ad 1000 ml A. dest. → wird autoklaviert

Zur Herstellung von YPD-Platten wurden 3 % (w/v) Agar zugegeben und alles zusammen autoklaviert

YPDA-Medium

Zur Herstellung von YPDA-Medium wurde YPD-Medium hergestellt. Nach dem Autoklavieren wurden 15 ml einer steriltfiltrierten 0,2 %igen Adeninhemisulfatlösung zugegeben.

Dropout-Medium

Aminosäure-Dropout-Mix:

je 2 g Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glycin,
Inositol, Isoleucin, Glutamat, Methionin, Phenylalanin,
Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin
0,2 g p-Aminobenzoesäure

Der Mix wurde zusammengegeben und ÜN in einem ausreichend großen Gefäß geschüttelt.

Aminosäure- und Basen-Lösungen (100x):

Leucin	1000 mg/100 ml
Adenin	200 mg/100 ml
Histidin	200 mg/100 ml
Uracil	200 mg/100 ml
Lysin	300 mg/100 ml
Tryptophan	200 mg/100 ml

Die Aminosäuren werden in kristalliner Form eingewogen, unter Rühren und evtl. leichtem Erhitzen gelöst und anschließend durch einen 0,2 µ Porengröße-Filter sterilisiert.

Aminosäure-Dropout-Medium:

6,7 g Hefe-Nitrogen-Basis
 2 g Dropout-Mix
 ad 300 ml A. dest. → wird autoklaviert

Zur Herstellung von Dropout-Platten wurde der Agar separat autoklaviert:

30 g Agar
 ad 600 ml A. dest. → wird autoklaviert

Die beiden Lösungen wurden nach dem Autoklavieren vereinigt. Dann erfolgte die Zugabe von 50 ml 20 %iger Glucoselösung und der benötigten Aminosäuren nach Abkühlung des Mediums auf ca. 60 °C.

Für geringe Mengen Medium wurden auch die Dropout-Mixe von Clontech (Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers verwandt.

III.5 Stämme

III.5.1 Hefestämme

Stamm Nr.	Bezeichnung/Genotyp	Quelle
1	Y187 MATa <i>ura3-52 leu2-3, 112 trp1-901 his-200 gal4Δ gal80Δ</i> <i>LYS2::GAL1uas-GAL1tata-HIS3</i> <i>GAL2uas-GAL2tata-ADE2</i> <i>URA3::MEL1uas-MEL1tata-lacZ MEL1</i>	Clontech (Heidelberg) James <i>et al.</i> , 1996

2	AH109 MATa <i>ura3-52 leu2-3, 112 trp1-901 his3-200 ade2-101 gal4Δ mef gal80Δ</i> <i>URA3::GAL1uas-GAL1tata-lacZ MEL1</i>	Clontech (Heidelberg) Harper <i>et al.</i> , 1993
3	AH109 Plasmid: <i>GAL4-AD -HA LEU2 2μ</i> = pGADT7	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
4	AH109 Plasmid: <i>GAL4-BD- Myc TRP1 2μ</i> = pGBKT7	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
5	Y187 Plasmid: <i>GAL4-AD -HA LEU2 2μ</i> = pGADT7	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
6	Y187 Plasmid: <i>GAL4-BD- Myc TRP1 2μ</i> = pGBKT7	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
7	AH109 Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS1-HA LEU2 2μ</i> = pGADT7- <i>BBS1</i>	Claudia Moch
8	AH109 Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS2-HA LEU2 2μ</i> = pGADT7- <i>BBS2</i>	Claudia Moch
9	AH104 Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS4-HA LEU2 2μ</i> = pGADT7- <i>BBS4</i>	diese Arbeit
10	AH109 Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS6-HA LEU2 2μ</i> = pGADT7- <i>BBS6</i>	diese Arbeit
11	AH109	Claudia Moch

	Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS7-HA LEU2</i> 2μ = pGADT7- <i>BBS7</i>	
12	AH109 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS1-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS1</i>	diese Arbeit Plasmid: Claudia Moch
13	AH109 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS2-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS2</i>	diese Arbeit Plasmid: Claudia Moch
14	AH109 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS4-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS4</i>	diese Arbeit
15	AH109 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS6-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS6</i>	diese Arbeit Plasmid: Daniela Lerche
16	AH109 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS7-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS7</i>	Claudia Moch
17	Y187 Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS1-HA LEU2</i> 2μ = pGADT7- <i>BBS1</i>	Claudia Moch
18	Y187 Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS2-HA LEU2</i> 2μ = pGADT7- <i>BBS2</i>	Claudia Moch
19	Y187 Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS4-HA LEU2</i> 2μ = pGADT7- <i>BBS4</i>	diese Arbeit
20	Y187 Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS6-HA LEU2</i> 2μ = pGADT7- <i>BBS6</i>	diese Arbeit

21	Y187 Plasmid: <i>GAL4-AD-BBS7-HA LEU2</i> 2μ = pGADT7- <i>BBS7</i>	Claudia Moch
22	Y187 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS1-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS1</i>	diese Arbeit Plasmid: Claudia Moch
23	Y187 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS2-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS2</i>	diese Arbeit Plasmid: Claudia Moch
24	Y187 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS4-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS4</i>	diese Arbeit
25	Y187 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS6-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS6</i>	diese Arbeit Plasmid: Daniela Lerche
26	Y187 Plasmid: <i>GAL4-BD-BBS7-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>BBS7</i>	Claudia Moch
27	Y187 Plasmid: <i>GAL4- LEU2</i> 2μ = pCL1	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
28	Y187 Plasmid: <i>GAL4-BD-lamin C-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>Lam</i>	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
29	Y187 Plasmid: <i>GAL4-BD-p53 C-Myc TRP1</i> 2μ = pGBKT7- <i>p53</i>	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
30	AH109 Plasmid: <i>GAL4-AD-T-antigen-HA LEU2</i> 2μ =	diese Arbeit Plasmid: Clontech

	pGADT7- <i>T</i>	(Heidelberg)
31	AH109 Plasmid: <i>GAL4-BD-p53 C-Myc TRP1</i> 2 μ = pGBKT7- <i>p53</i>	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
32	Y187 Plasmid: <i>GAL4-AD-T-antigen-HA LEU2</i> 2 μ = pGADT7- <i>T</i>	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
33	AH109 Plasmid: <i>GAL4-BD-lamin C-Myc TRP1</i> 2 μ = pGBKT7- <i>Lam</i>	diese Arbeit Plasmid: Clontech (Heidelberg)
34	Y187 Plasmide: <i>GAL4-AD-cDNA-Library-HA LEU2</i> 2 μ <i>Amp^r</i> = pACT2- <i>cDNA-Library</i>	Clontech (Heidelberg)

III.5.2 Bakterienstämme:

Dh5 α

Genotyp: *SupE44 lacU169* (80*lacZ*M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA69 thi-1 relA149*
(Sambrook *et al.*, 1989)

TOP F 10

Genotyp: F' {*lacI^qTn10* (Tet^R)} *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ *lacZ* Δ M15 Δ *lacX74*
recA1 deoR araD139 Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*
(invitrogen®)

III.6 Plasmide

Die genannten Plasmide enthielten, soweit keine andere Resistenz angegeben ist, eine Ampicillin-Resistenz zur Selektion in *E. coli*-Bakterien.

Plasmid Nr.	Charakterisierung/Bezeichnung	Quelle
1	Two-Hybrid-Beutevektor: <i>GAL4-AD HA Amp^r 2μ LEU2 = pGADT7</i>	Clontech (Heidelberg)
2	Two-Hybrid-Angelvektor: <i>GAL4-BD Myc Kan^r 2μ TRP1 = pGBKT7</i>	Clontech (Heidelberg)
3	<i>GAL4-AD-BBS1-HA LEU2 2μ = pGADT7-BBS1</i>	Claudia Moch
4	<i>GAL4-AD-BBS1-HA LEU2 2μ = pGADT7-BBS2</i>	Claudia Moch
5	<i>GAL4-AD-BBS1-HA LEU2 2μ = pGADT7-BBS4</i>	diese Arbeit
6	<i>GAL4-AD-BBS1-HA LEU2 2μ = pGADT7-BBS6</i>	diese Arbeit
7	<i>GAL4-AD-BBS1-HA LEU2 2μ = pGADT7-BBS7</i>	Claudia Moch
8	<i>GAL4-BD-BBS1-Myc TRP1 2μ = pGBKT7-BBS1</i>	Claudia Moch
9	<i>GAL4-BD-BBS1-Myc TRP1 2μ = pGBKT7-BBS2</i>	Claudia Moch
10	<i>GAL4-BD-BBS1-Myc TRP1 2μ = pGBKT7-BBS4</i>	diese Arbeit
11	<i>GAL4-BD-BBS1-Myc TRP1 2μ = pGBKT7-BBS6</i>	Daniela Lerche
12	<i>GAL4-BD-BBS1-Myc TRP1 2μ = pGBKT7-BBS7</i>	Claudia Moch
13	<i>GAL4- LEU2 2μ = pCL1</i>	Clontech (Heidelberg)
14	<i>GAL4-BD-lamin C-Myc TRP1 2μ = pGBKT7-Lam</i>	Clontech (Heidelberg)
15	<i>GAL4-BD-p53 C-Myc TRP1 2μ = pGBKT7-p53</i>	Clontech (Heidelberg)
16	<i>GAL4-AD-T-antigen-HA LEU2 2μ = pGADT7-T</i>	Clontech (Heidelberg)
17	<i>GAL4-AD-cDNA-Library-HA LEU2 2μ Amp^r</i> <i>= pACT2- cDNA-Library</i>	Clontech (Heidelberg)

III.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide dienten als Primer für die Polymerasekettenreaktionen, die in dieser Arbeit aufgeführt sind. Des Weiteren wurden Oligonukleotide als Primer für Sequenzierungen verwandt. Alle aufgeführten Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Länge
3'LD Insert-Screening-Primer	5'-AAGTGAAC TTGCGGGG TTTTTCAGTA TCTACG-3'	32 bp
5'LD-Insert-Screening-Primer	5'-CTATTCGATGATGAAGATACCCAC AAACCC-3'	32 bp
5'LD-Insert-Sequencing-Primer	5'-CGATGATGAAGATACCCAC-3'	20 bp
<i>BBS4-f-EcoR1</i> -HPLC	5'-AATTTAGAATTCATGGCTGAGGAGAGA GTCGCGACG-3'	36 bp
<i>BBS4-r-BamH1</i> -HPLC	5'-AGCTACGGATCCTTATTCTCTCTTAT TTGTTCTGA-3'	36 bp
BBS4-Seq-f-Primer	5'-ACGATCTGACTTATATAATGCTGG-3'	24 bp
BBS4-Seq-r-Primer	5'-GTAGAGCTCCCCCATCTTTGGCTG-3'	24 bp
<i>BBS6-Th-f</i> -Primer	5'-TAGCTTGAATTCATGTCTCGTTTGGAA GCTAAGAAG-3'	36 bp
3'AD-Insert-Sequencing-Primer	5'-AGATGGTGCACGATGCACAG-3'	20 bp
DNA-BD-Sequencing-Primer	5'-TAAGAGTCACTTTAAAATTTGTAT-3'	24 bp
<i>Gal4</i> -AD-Sequencing-Primer	5'-TACCACTACAATGGATG-3'	17 bp

<i>BBS6-R-Xho1-Primer</i>	5'-TGCTTACTCGAGGTTTTTATCTTCAAT AACATATGAAAG-3'	39 bp
<i>BBS6-TH-r-Primer</i>	5'-TGCTTAGTCGACGTTTTTATCTTCAAT AACATATGAAAG-3'	39 bp
T7-Primer	5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'	21 bp
DNA-BD-Seq.II-Primer	5'-TTTTCGTTTTTAAACCTAAGAGTC-3'	24 bp
<i>BBS6-6aR-Primer</i>	5'-CCAGTTGAGTTCTTCCTGGGC-3'	21 bp
<i>BBS6-3cF-Primer</i>	5'-GATCCTCCTTTGTTTGGTGC-3'	20 bp

III.8 Enzyme und Antikörper

Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Quelle
α -Maus-Peroxidase	1: 4.000	Roche (Mannheim) (freundlichst zur Verfügung gestellt von der AG Eilers)
α -Maus-Peroxidase	1 : 8.000	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
α -Myc	1: 1.500	9E10-Hybridoma- Überstand (freundlichst zur Verfügung gestellt von der AG Eilers, IMT Marburg)

Enzym	Bezugsquelle
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas (Eggenstein)
<i>Pfu</i> -Polymerase	MBI Fermentas (Eggenstein)
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas; Invitrogen (Eggenstein)

III.9 Kits

Kit	Bezugsquelle
ABI Prism Dye Terminator	Perkin Elmer (New Jersey, USA)
DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction System	Amersham Pharmacia (USA)
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN MinElute Kit	Qiagen (Hilden)
ImMedia™ Amp Blue	Invitrogen (CA, USA)
PowerScript™ Reverse Transcriptase	Clontech (Heidelberg)

III.10 Genbibliothek und mRNA

Bezeichnung	Bezugsquelle
Pretransformed Human Kidney MATCHMAKER cDNA Library	Clontech (Heidelberg)

III.11 Verwendete Datenbanken im Internet

OMIM: Online Mendelian inheritance in man:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

Pubmed.: <http://www.pubmed.gov>

BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

NCBI-Nucleotide: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

IV Methoden

IV.1 Molekularbiologische Methoden

IV.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

IV.1.1.1 Mini-Plasmidisolierung aus *E. coli*

E. coli-Bakterienzellen aus 5 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert (4000 rpm, 15 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Sol 1-Lösung resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 200 µl Sol 2-Lösung zugegeben und durch Inversion gemischt, und es folgte eine Inkubation für genau 5 min bei RT. Es folgte die Zugabe von 100 µl eiskalter Sol 3-Lösung und nach Inversionsmischung eine Inkubation von genau 5 min auf Eis. Auf diese Weise wurden die durch alkalische Lyse freigesetzten Proteine und DNA gefällt. Zelltrümmer und das Präzipitat wurden durch Zentrifugation sedimentiert (13.000 rpm, 5 min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 400 µl PCI zugefügt und die Mischung intensiv gevortext. Durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min) wurde die wässrige, Plasmid-DNA-enhaltende Phase separiert und überführt. Durch Zugabe von 800 µl Ethanol abs. und anschließender Inkubation für 10 min auf Eis wurde die DNA gefällt. Durch Zentrifugation (13.000 rpm, 5 min) wurde sie sedimentiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Plasmid-DNA-Pellet bei 37 °C getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl Wasser, dem 1 µl einer 10 mg/ml RNase-Lösung zugesetzt war, resuspendiert.

Lösungen:

- <u>Sol 1-Lösung:</u>	25 mM	Tris/HCl pH 8
	50 mM	Glucose
	10 mM	EDTA pH 8
- <u>Sol 2-Lösung:</u>	1 %	SDS
	0,2 N	NaOH

- Sol 3-Lösung: 2,5 M KAc
 9,6 % Eisessig
 → auf pH 5,2 einstellen

IV.1.1.2 Säulenpräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Sequenzierung verwendete Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kits“ und des „QIAGEN Plasmid Kit“ aus den Bakterien gewonnen. Die Vorgehensweise orientierte sich am mitgelieferten Protokoll des Herstellers.

IV.1.2 Reinigung und DNA-Präzipitation

Die DNA-Lösung aus IV.1.1.1 wurde auf 500 µl aufgefüllt. Dazu wurden 500 µl PCI zugegeben, und die Mischung wurde gevortext. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 2 min. Durch die Zentrifugation wurden zwei Phasen sichtbar. In der oberen Phase war die DNA in PCI gelöst. Es wurden 400 µl von der oberen Phase entnommen, wobei keine Vermischung mit der unteren Phase stattfinden durfte.

Befand sich wenig DNA in dem Ansatz wurden 10 µl einer 10 µg/µl tRNA-Lösung zugegeben. Die tRNA dient als Träger der DNA während der Präzipitation. So kann die DNA-Ausbeute bis auf das 10fache erhöht werden.

Zur Fällung der DNA wurde 1/10 (40 µl) des Volumens der DNA-Lösung einer 3 M Natriumacetat-Lösung mit pH 7 zugegeben. Außerdem wurde das 2,5fache des Volumens der DNA-Lösung an 100%igen Ethanol zugefügt. Dann erfolgte eine Inkubation über Nacht bei -20 °C oder eine halbe Stunde bei -80 °C. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zentrifugiert in einer kühlbaren Zentrifuge bei 4 °C für 20 min bei 13.000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde luftgetrocknet bei RT oder 37 °C. Die DNA wurde schließlich in 10-50 µl A. dest. aufgenommen und die DNA-Konzentration spektralphotometrisch ermittelt.

IV.1.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde spektralphotometrisch gegen A. dest. als Referenz ermittelt. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ an doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

IV.1.4 Analyse von DNA durch Agarosegelelektrophorese

Zur größenabhängigen (Größe $\sim 1/\log$ Laufstrecke) Auftrennung von DNA-Fragmenten (restringierte DNA, PCR-Produkte) wurden horizontale 1%ige TBE-Agarosegele mit 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid verwandt. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwandt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 1/10 Volumen Probenpuffer versetzt und bei 10 V/cm^2 aufgetrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde ein Größenmarker aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese variierte zwischen 20 min und 2 h. Über das interkalierende Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels einer Videokamera mit angeschlossenem Videoprinter dokumentiert werden.

IV.1.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA wurde aus Agarosegelen gewonnen, indem die DNA-Bande in der gewünschten Laufhöhe unter Sichtbarmachung durch möglichst kurze UV-Transillumination excisiert wurde. Standardmäßig wurden 1 %ige Agarosegele verwandt. Die Extraktion der DNA aus dem ausgeschnittenen Gelstück erfolgte mit Hilfe des „QIAgen Gel Extraction Kits“ entsprechend dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers. Die Agarose wird in diesem System durch Natriumperchlorat aufgelöst und die DNA in einem Zentrifugationssäulchen an eine Silica-Membran gebunden. Die Elution der DNA in TE-Puffer erfolgte nicht immer, wie im Protokoll vorgeschlagen, in 50 μl , sondern oft in kleineren Volumina ($> 20 \mu\text{l}$). Auf diese Weise sollte eine höhere Konzentration der gewonnenen DNA-Lösung erreicht werden. Außerdem wurde zu diesem Zweck der TE-Puffer vor der Elution auf 70 °C erwärmt.

IV.1.6 DNA-Klonierung

IV.1.6.1 cDNA-Synthese

Die cDNA- Synthese erfolgte mit Hilfe des PowerScript™-Kits (Clontech, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers. Als RNA-Matrize wurden 5 µg Total-RNA aus menschlicher, embryonaler Niere eingesetzt (Clontech, Heidelberg). In PCR-Reaktionen wurde 1 µl der erhaltenen cDNA-Lösung als Matrize eingesetzt.

IV.1.6.2 PCR

Die Reaktionen wurden mit dem Thermocycler, GeneAmp PCR System 2400 und 9600 (Perkin Elmer Cetus, USA) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz hatte standardmäßig ein Volumen von 100 µl. Die Anzahl der durchgeführten Zyklen (Denaturierung, Hybridisierung, Elongation) betrug 35. Dem ersten PCR-Zyklus ging eine 5 minütige Denaturierungsphase bei 95 °C voraus. Dem letzten Zyklus schloss sich eine Elongationsphase von 5 min bei 72 °C an.

Reaktionsansatz (100 µl):

1 µl	DNA-Matrize (cDNA oder DNA aus Gelextraktion)
1 x	PCR-Puffer
200 µM	dNTPs
3 µM	Primer 1
3 µM	Primer 2

Optional waren die Zugabe von DMSO und/oder Formamid zur Aufbrechung von Haarnadelstrukturen in der Matrizen-DNA, sowie die Zugabe von MgSO₄ zur Erhöhung der Menge des PCR-Produkts.

PCR-Zyklus:

Denaturierung	95 °C	0,5 min
Hybridisierung	50 °C	0,5 min
Elongation	72 °C	1 min/500 bp

Die Hybridisierungstemperatur wurde variiert: sie wurde erniedrigt, falls kein PCR-Produkt bei den Standardbedingungen detektierbar war; sie wurde erhöht, wenn unspezifische PCR-Produkte polymerisiert wurden.

Lösungen:

- <u>dNTP-Lösung:</u>	2 mM	dATP
	2 mM	dCTP
	2 mM	dGTP
	2 mM	dTTP

IV.1.6.3 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen stammen aus Bakterien, denen sie zur Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen innerhalb spezifischer DNA-Sequenzen (meist Palindrome) fremder Organismen mit Schädigungs-Potential dienen. Sie können entweder glatte (blunt) oder kohäsive, überhängende (sticky) Schnittstellen in der DNA erzeugen. Kompatible Enden können mit Hilfe einer Ligationsreaktion kovalent verknüpft werden. In analytischen Reaktionsvolumina wurden bis zu 2 µg DNA mit 5-10 U des Enzyms/µg DNA hydrolysiert. Für präparative Erfordernisse wurden die Volumina der Komponenten entsprechend der eingesetzten DNA-Menge vergrößert. Die Inkubationstemperatur betrug in der Regel 37 °C, die Inkubationsdauer variierte zwischen 1 h und ÜN-Inkubationen abhängig vom erwünschten Ausmaß der hydrolytischen Spaltung. Zur Entfernung der Reaktionskomponenten wurde die DNA anschließend aus einem Agarosegel eluiert.

IV.1.6.4 Ligation

Zur Herstellung rekombinanter Plasmide wurden DNA-Fragmente durch das Enzym T4-DNA-Ligase mit adäquat restringierter Vektor-DNA kovalent verbunden. Dieses Enzym bildet Phosphodiesterbindungen zwischen kompatiblen kohäsiven (sticky ends) oder zwischen glatten Enden (blunt ends). Standardmäßig wurden 100 ng restringierte Vektoren eingesetzt, die nach dem erfolgten Restriktionsverdau gelelektrophoretisch von den exzisierten Fragmenten getrennt und aus dem Agarosegel gewonnen wurden. Das molare Verhältnis von Fragment zu Vektor wurde standardmäßig gleich zwei gesetzt. Die einzusetzende Menge des restringierten Insertionsfragmentes berechnete sich nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Masse des Vektors [ng]} \times \text{kb-Größe des Fragments}}{\text{Kb Größe des Vektors}} \times \text{molares Verhältnis} = \frac{\text{Fragment}}{\text{Vektor}} \times \text{Masse des Fragments}$$

Aufgrund des Ergebnisses dieser Rechnung ergab sich folgender Reaktionsansatz:

Reaktionsansatz:

Ermittelte Fragmentmenge

100 ng Vektor

1 µl 10xPuffer für T4-Ligase

1 µl T4-Ligase (1 U/µl)

x µl H₂O

ad 10 µl

Neben diesem Ligationsansatz wurde ein Kontrollansatz zusammengestellt, in dem das Insertionsfragment durch Wasser ersetzt wurde. Die Inkubation des Reaktions- und des Kontrollansatzes erfolgte 1 h bei 20 °C. Danach wurden beide Ansätze in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert und diese über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Zahl der gewachsenen Kolonien, in die der Kontrollansatz transformiert wurde, lieferte Informationen über das Maß der Religation des Vektors.

IV.1.7 Transformation

IV.1.7.1 Herstellung chemisch-ultrakompetenter *E. coli*

10 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen *E. coli* - Kolonie inokuliert und ÜN bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag erfolgte eine Verdünnung der Zellsuspension in 250 ml SOB-Medium und eine erneute Inkubation bei 37 °C, bis die Zellkultur eine Dichte von OD₆₀₀ = 0,6 erreicht hatte. Die Kultur wurde dann auf 50 ml-Aliquots verteilt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (4000 rpm, 15 min), das Pellet wurde in 80 ml TB resuspendiert und die Zellsuspension erneut 10 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der gleiche Zentrifugationsschritt zur Sedimentation der Zellen. Die Aufnahme des Zellpellets erfolgte in 20 ml eiskaltem TB mit 1,5 ml DMSO. Es folgte eine weitere Inkubation für

10 min auf Eis. Die Zellsuspension wurde abschließend zu 500 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren, die Zellen wurden bei – 80 °C gelagert.

Lösungen:

- <u>TB</u> :	10 mM	Pipes → auf pH 7 eingestellt
	55 mM	MnCl ₂
	250 mM	KCl
	15 mM	CaCl ₂

IV.1.7.2 Herstellung von Gefrierkulturen elektrokompetenter *E. coli*

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* wurden zwei Methoden verwandt, die sich in der Möglichkeit unterschieden, die kompetenten Zellen bei –80 °C einzulagern. Entscheidend ist bei beiden Protokollen, dass alle Komponenten ununterbrochen auf Eis gekühlt werden. Zur Herstellung lagerbarer elektrokompetenter Bakterien wurde eine einzelne Bakterienkolonie in 3 ml LB-Medium angeimpft und über Tag bei 37 °C geschüttelt, von dieser Kultur wurden 500 µl entnommen, in 30 ml LB angeimpft und über Nacht inkubiert. Aus dieser Kultur wiederum wurden 10 ml entnommen und zur Beimpfung von 1 l LB-Medium verwandt. Diese Kultur wurde dann so lange bei 37 °C geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,5-07 erreicht hatte. Die Kultur wurde dann sofort auf Eis gekühlt, in gekühlte, sterile Zentrifugationsbehältnisse überführt und in einer vorgekühlten Zentrifuge bei 400 rpm für 10 min pelletiert. Danach erfolgten mehrere (4-5) Waschschrte mit je 500 ml eiskaltem 10 %igen sterilem Glycerol. Das Pellet wurde letztlich in 1 ml 10 %igen sterilem Glycerol resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zu 60 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung konnte dann für ein halbes Jahr bei –80 °C erfolgen.

Lösungen: 10 %iges steriles Glycerol

IV.1.7.3 Herstellung von sofort zu verwendenden elektrokompetenten *E. coli*

Zu diesem Zweck wurden 100 ml des reichhaltigen TB-Mediums mit 200 µl einer ÜN-Kultur von *E. coli* beimpft. Die Kultur wurde 5-6 h bei 37 °C geschüttelt bis eine OD₆₀₀ > 2 erreicht war. Es folgte die Pelletierung der Kultur bei 600 g für 5 min. Danach schlossen sich wiederum mehrere Waschschrte (5-6) mit je 50 ml eiskaltem 10 %igen

sterilem Glycerol an. Schließlich wurde das Pellet in 2 ml 10 %igem Glycerol resuspendiert und bis zur Verwendung der elektrokompenten Zellen auf Eis gelagert.

Lösungen: 10 %iges steriles Glycerol

IV.1.7.4 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*

Es wurden standardmäßig 100 ng Plasmid-DNA oder 2,5 µl eines Ligationsansatzes zur Transformation eingesetzt. 100 µl ultrakompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut und die Plasmid-DNA der Zellsuspension zugefügt, anschließend erfolgte eine Mischung durch Inversion. Die Zellsuspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Während des sich anschließenden Hitzeschocks (2 min, 42 °C), sollte die Aufnahme der DNA in die Zelle erfolgen. Nach dem Hitzeschock wurde sofort 1 ml SOB-Medium dem Ansatz zugegeben und er wurde für 2 h bei 37 °C geschüttelt (phänische Phase). Die Zellen wurden dann durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) sedimentiert, der Überstand dekantiert, und in dem verbleibenden SOB-Tropfen wurde das Pellet resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf selektivem LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

IV.1.7.5 Transformation elektrokompenter *E. coli*

Bei der Transformation elektrokompenter Bakterien müssen alle Komponenten strikt auf Eis gehalten werden. Zur Transformation werden 1-5 ng DNA, z. B. 1 µl Hefepiasmid verwandt. Die DNA sollte möglichst salzarm sein, um Fließströme zu vermeiden. Die DNA wurde in 60 µl Bakteriensuspension resuspendiert und in eine 0,2 cm-Elektroporationsküvette luftblasenfrei überführt. Die Küvette wurde abgewischt und in den Elektroporator eingespannt. Nach einer Widerstandsmessung erfolgte der Stromimpuls mit folgenden Parametern: 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω. Anschließend wurde sofort 1 ml eiskaltes SOC-Medium zugegeben und die Kultur in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation für 1 h bei 37° C, danach wurde die Kultur zentrifugiert, das Pellet resuspendiert und auf selektivem LB-Agar plattiert, der über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde.

IV.2 Methoden mit *Saccharomyces cerevisiae*

IV.2.1 Genomische DNA-Päparation aus *S. cerevisiae*

Hefezellen aus 5 ml einer saturierten Hefekultur wurden durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach einmaligem Waschen in 500 µl H₂O wurden die Zellen in 20 µl H₂O resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von Detergenz-Lysis-Puffer, PCI und Glasperlen, die Mischung wurde für mehrere Minuten bei 4 °C gevortext. Dieser Vorgang dient der mechanischen und chemischen Aufschlagung der Zellen, die DNA wird dabei freigesetzt und geht in Lösung. Zu der Mischung wurde 200 µl TE-Puffer zugegeben, es wurde gevortext und durch anschließende Zentrifugation eine Separierung der Phasen erreicht. In der oberen wässrigen Phase befindet sich die von Proteinen befreite DNA. Diese wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 6 µl 7,5 M Ammoniumacetat und von 1 ml Ethanol abs. und anschließende Inversion der Lösung wurde eine Fällung der DNA erreicht. Durch die folgende Zentrifugation (5 min, 12000 rpm) wurde sie pelletiert, dann getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. 1 µl der gewonnen DNA-Lösung wurde für PCR-Reaktionen als Matrize eingesetzt.

Lösungen:

- <u>Detergenz-Lysis-Puffer:</u>	2 %	Triton X-100
	1 %	SDS
	100 mM	NaCl
	10 mM	Tris pH 8
	1 mM	EDTA

- <u>TE-Puffer:</u>	10 mM	Tris pH 7,5
	1 mM	EDTA

- 7,5 M Ammoniumacetatlösung

IV.2.2 Plasmid-Extraktion aus *S. cerevisiae*

Die Hefezellen aus einer 5 ml ÜN-Kultur der stationären Phase wurden durch Zentrifugation sedimentiert (2000 rpm, 5 min). Das Pellet wurde in 300 µl Cracking-Puffer resuspendiert und in eine 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 400 µl PCI und 300 µl Glassperlen zugegeben. Durch eine zweiminütiges Vortexen erfolgte die mechanische und chemische Aufschlagung der Zellen. Die freigesetzte Plasmid-DNA löst sich in der wässrigen Phase, die Proteine u. a. in PCI. Durch Zentrifugation (13.000 rpm, 2 min) lassen sich die beiden Phasen separieren. Die obere Phase wurde überführt und durch Zugabe von 1 ml Ethanol abs. erfolgte die Ausfällung der DNA, die anschließend durch Zentrifugation (13.000 rpm, 2 min) sedimentiert wurde. Es folgte ein Waschschrift mit 70 %igem Ethanol, dann wurde das Plasmid-DNA-Pellet getrocknet und in 40 µl sterilem Wasser resuspendiert.

Lösungen:

- <u>Cracking-Puffer:</u>	2 %	Triton X-100
	1 %	SDS
	0,2 M	NaCl
	10 mM	Tris-HCl pH 8
	1 mM	EDTA

IV.2.3 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Es werden 25 ml der geeigneten Hefe-Flüssigkultur benötigt, die OD₆₀₀ sollte ca. 2 betragen. Durch Zentrifugation bei 3000 rpm für 5 min wurden die Hefezellen sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert. Es wurde erneut zentrifugiert für 2 min bei 14000 rpm und der Überstand verworfen. Es folgte die Zugabe von 100 µl Glassperlen und 200 µl Probenpuffer, dem frisch Mercaptoethanol zugegeben worden war. Außerdem wurde 5 µl Proteaseinhibitor-Cocktail pro 100 µl Zellpellet zugegeben. Die Mischung wurde für 5 min bei höchster Geschwindigkeit gevortext und dann kurz zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteine enthielt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Vor dem Einsatz der Proteinlösung im Western-Blot wurde diese für 5 min im

Wasserbad aufgekocht. Die Proteinlösung sollte bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden, um einen Abbau der Proteine zu verhindern.

Lösungen:

- Probenpuffer: 1,8 g Tris
 30 ml Glycerol

beides ÜN unter leichter Erwärmung rühren lassen

am nächsten Tag auf 50 ml auffüllen und pH 6,8 einstellen

7,2 g SDS zugeben und lösen

1 Spatelspitze Bromphenolblau zugeben

Probenpuffer zu 1 ml aliquotieren, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern und vor Gebrauch 175 μl Mercaptoethanol zugeben

IV.2.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Es wurde eine 5 ml-ÜN-Zellkultur der Dichte $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml verwandt. Durch Zentrifugation (2000 rpm, 5 min) wurden die Zellen sedimentiert und zwei Waschschritten unterzogen (1x in 1 ml H_2O und 1 x in 1ml TE/LiOAc). Die Zellen wurden mit TE/LiOAc auf 1×10^9 Zellen/ml verdünnt und von dieser kompetenten Zellsuspension wurden 50 μl pro Transformation verwandt. Als Träger der zu transformierenden DNA wurde ssDNA benutzt, diese wurde für 5 min bei $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgekocht und anschließend 2 min auf Eis sehr schnell abgekühlt. 50 μg dieser ssDNA wurde zusammen mit 1 μg der zu transformierenden Plasmid-DNA der Zellsuspension zugefügt. Dann erfolgte die Zugabe von 300 μl PEG/LiOAc/TE, um die Zellmembran zu permeabilisieren. Die Mischung wurde intensiv gevortext und anschließend für min 30 min bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ auf einem Rotator inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 15 min. Die Zellen wurden zentrifugiert (12.000 rpm, 10 s) und mit 1 ml H_2O gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation (12.000 rpm, 10 s) wurde das Zellpellet in 100 μl sterilem H_2O aufgenommen und die Zellsuspension auf selektive Platten ausplattiert.

Lösungen:

- 1 M LiOAc \rightarrow der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt
- PEG 4000: 50% PEG

- TE/LiOAc:
 - 1 x TE
 - 1 x LiOAc

- PEG 4000/LiOAc/TE:
 - 40% PEG 4000
 - 1 x LiOAc
 - 10 mM Tris pH 7,5
 - 1 mM EDTA

IV.2.5 Mating von *S. cerevisiae*

IV.2.5.1 Mating auf einer YPD-Agar-Platte

Zur Kreuzung zweier Hefestämme mit unterschiedlichen Mating-Typen wurde ein gemeinsamer Ausstrich der Stämme auf einer YPD Agarplatte vorgenommen. Dabei wurden die beiden Hefestämme zum Teil vermischt (s. Abb.). Anschließend wurde die Platte für 24 h bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Replikationsplattierung mit Samtstempeln auf eine selektive Agarplatte, auf der nur diploide Zellen wachsen sollten. Das Zellwachstum sollte also nur in dem Bereich des Ausstrichs erfolgen, in dem die Hefestämme vermischt worden waren. War dies der Fall, konnten die Hefen als diploid angesehen und weiter benutzt werden.

IV.2.5.2 „Small-scale“-Mating

Zu diesem Zweck wurde jeweils eine Kolonie der zu kreuzenden Hefestämme in 0,5 ml YPD-Medium in einem Reaktionsgefäß resuspendiert. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100 der Matingkultur auf verschiedenen Platten ausplattiert. Zum einen auf Platten, die jeweils einen Matingpartner selektierten und zum anderen auf Platten, die die diploiden Zellen selektierten. Diese Platten wurden dann einige Tage bei 30 °C inkubiert, bis sich ein Wachstum feststellen ließ. Aus der Zahl der Kolonien auf den jeweiligen Platten konnte die Mating-Effizienz berechnet werden: sie ergibt sich aus dem Anteil der koloniebildenden Einheiten der diploiden Zellen an der Zahl der koloniebildenden Einheiten des limitierenden Mating-Partners.

IV.2.6 β -Galactosidase-Aktivitätstests

IV.2.6.1 LacZ-Filter-Kolonie-Assay für Hefen

Dieser Assay gehörte zu den Tests des Two-Hybrid-Screens. Durch seine Anwendung kann festgestellt werden, ob das Enzym β -Galactosidase in den getesteten Zellen aktiv ist. Ist dies der Fall, kann eine blaue Farbreaktion beobachtet werden. Es wurden Zellsuspensionen auf Filter aufgetropft, die auf selektiven Platten inkubiert wurden, bis deutlich sichtbar Zellwachstum stattgefunden hatte. Die Filter wurden dann für zehn Sekunden in flüssigen Stickstoff getaucht, so wurde eine Permeabilisierung der darauf befindlichen Zellen erreicht. Anschließend wurde der Filter in eine Lösung aus 1,2 ml Z-Puffer und 180 μ l X-Gal (20 μ g/ml in DMF) getaucht. Es folgte eine Inkubation bei RT oder 30 °C bis eine deutliche Blaufärbung der Positivkontrolle sichtbar wurde.

Lösungen:

- | | | |
|--------------------|---------------|--|
| - <u>Z-Puffer:</u> | 10,7 g | $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ |
| | 5,5 g | $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ |
| | 0,75 g | KCl |
| | 0,25 g | $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ |
| | <u>2,7 ml</u> | 2-Mercaptoethanol |
| | ad 1l | |
- X-Gal: 100 mg/ml in Dimethylformamid (DMF)

IV.2.6.2 Flüssig-lacZ-Assay

Dieser Assay dient der Quantifizierung der Aktivität des β -Galactosidase-Enzyms. Diese wird mit Hilfe einer Farbreaktion durch Umsetzung des Substrates ONPG zu Galactose und dem chromogenen *o*-Nitrophenol messbar. Die zu testenden Zellen wurden in einer 5 ml-Kultur über Nacht angezogen. Sie wurden weiter behandelt, sobald sie eine Dichte von 5×10^6 bis 2×10^7 erreicht hatten (logarithmische Wachstumsphase), die OD_{600} der Zellsuspension wurde notiert. Es wurden 1,5 ml Zellsuspension pro Kultur entnommen und in Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden einmal mit Z-Puffer gewaschen und dann in 300 μ l Z-Puffer aufgenommen ($V = 1500 \mu\text{l}/300 \mu\text{l} = 5$). 100 μ l der Zellsuspension wurden entnommen und einem

Zyklus von Einfrieren und Auftauen unterzogen: Die Zellen wurden jeweils dreimal abwechselnd für eine Minute in flüssigen Stickstoff und in ein 37 °C-Wasserbad getaucht. Dann wurde 700 µl Z-Puffer zu den aufgeschlossenen Zellen gegeben, sowie ein Reaktionsgefäß mit 800 µl Z-Puffer versehen, das als Referenz diente. Dann wurden 160 µl ONPG als Substrat den Reaktionen zugegeben und gleichzeitig eine Zeitmessung gestartet. Die Reaktion fand bei 30 °C statt. Sobald eine Gelbfärbung durch die Entstehung von *o*-Nitrophenol sichtbar wurde, wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 M Na₂CO₃ abgestoppt und die verstrichene Zeit notiert (t). Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min, der Überstand wurde überführt und die OD₄₂₀ gegen den Referenzwert gemessen. Aus den gewonnen Werten konnte die Galactosidase-Aktivität mit folgender Formel berechnet werden:

$$1000 \times \text{OD}_{420} / t \times V \times \text{OD}_{600}.$$

Lösungen:

- Z-Puffer: s. LacZ-Kolonie-Filter-Assay
- 1 M Na₂CO₃
- ONPG : 4 mg/ml in Z-Puffer

IV.3 Proteinbiochemische Methoden

IV.3.1 SDS-PAGE

Die Proteinanalyse der Proben erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE. Dazu fanden selbstgegossene Minigele der Größe 6 x 10 cm mit einem standardmäßigen Acrylamid/Bisacrylamid-Gehalt von 9 % Verwendung. Ausnahmsweise kamen auch Gele mit 10 % zum Einsatz. Dabei entfielen auf das Trenngel etwa 8,5 cm auf das Sammelgel rund 1,5 cm Laufstrecke (ohne Taschen). Die folgende Zusammensetzung der beiden Gelschichten bezieht sich auf 9 %ige Gele. Der Anteil Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung ist bei niedrigerprozentigen Gelen zugunsten der Wassermenge entsprechend zu reduzieren.

Lösungen:

- <u>Trenngel:</u>	4,3 ml	H ₂ O
	2,5 ml	1M Tris pH 8,8
	3 ml	Acrylamid/Bisacrylamid 30%
	100 µl	10% SDS
	20 µl	TEMED
	100 µl	APS
- <u>Sammelgel:</u>	2,7 ml	H ₂ O
	500 µl	1M Tris pH 6,8
	670 µl	Acrylamid/Bisacrylamid 30%
	40 µl	10% SDS
	3,3 µl	TEMED
	42 µl	APS

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit H₂O überschichtet (glatte Phase, keine Austrocknung). Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und sofort die Kämme eingesteckt. Nach 20 min wurde die selbstgebaute Gelgießapparatur auseinandergebaut: Maximal 15 µl Probe wurden mit 5 µl SDS-Probenpuffer (mit frisch zugefügten β-Mercaptoethanol) versetzt, da sich 20 µl als praktisches Maximalvolumen für den Auftrag in die Geltaschen erwiesen haben. Die Denaturierung erfolgte für 5 min bei 95 °C, anschließend wurde das Kondenswasser von Gefäßwand und -deckel kurz abzentrifugiert und die Proben aufgetragen. Der SDS-Laufpuffer wurde sowohl als Anoden- als auch als Kathodenpuffer eingesetzt. Zu Beginn der Elektrophorese wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Mit dem vollständigen Übergang der Proben ins Trenngel wurde auf 120 V erhöht. Abschließend wurde ein Elektro-Blotting oder eine Coomassiefärbung angeschlossen.

IV.3.2 Coomassie-Färbung

Zur Färbung eines Proteingels wird dieses für 5 – 10 min in Coomassie-Färbelösung getaucht und geschwenkt. Zum Entfärben wird zunächst das Gel zunächst zweimal mit

A. dest. abgespült, danach wird es für 5 - 10 min in Entfärbelösung geschwenkt. Schließlich erfolgt eine Inkubation über Nacht in A. dest. auf einer Wippe. Durch diesen letzten Schritt wird der Hintergrund vollständig ausgewaschen.

Lösungen:

- <u>Coomassie-Färbelösung:</u>	50 %	Methanol
	10 %	Essigsäure
	0,2 %	Coomassie Blue R-250
- <u>Coomassie-Entfärber:</u>	30 %	Ethanol
	7,5 %	Essigsäure

IV.3.3 Semidry-Blotting

Die Nitrocellulosemembran und das Blotting-Papier (1,2 mm) wurden bei dieser Methode auf Gelgröße zugeschnitten und wie das SDS-Page-Gel 10 min mit Transferpuffer äquilibriert. Anschließend wurde ein Sandwich zusammengebaut (Anode - drei Lagen Blotting-Papier - Membran - Gel - drei Lagen Blotting-Papier - Kathode). Das feuchte Sandwich wurde durch vorsichtiges Überrollen mit einem Glasstab von eingeschlossenen Luftblasen befreit und mit etwas Transferpuffer übergossen. Abschließend wurde der Blotter durch Aufsetzen der Kathode geschlossen. Dabei wurde durch sanften Druck der feste Sitz des Sandwichs zwischen den Elektrodenplatten gewährleistet. Der Transfer erfolgte über eine Stunde bis 1,5 Stunden bei 90 mA ($1,5 \text{ mA/cm}^2$). Nach dem Blotten wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Damit wurde überprüft, ob Protein auf die Membran transferiert worden war und die Markerbanden wurden mit einem Bleistiftstrich gekennzeichnet. Nach dem Entfernen der Farbstofflösung mit Wasser, konnte die Blockierung der Membran stattfinden.

Lösungen:

- <u>Transferpuffer:</u>	25 mM Tris
	190 mM Glycin
	0,1 % SDS
	20 % Methanol
- <u>Ponceau S:</u>	0,2 % Ponceau S in 3 % TCA

IV.4 Immunologische Detektionsverfahren

IV.4.1 Western-Blot

Nach SDS-Page und Blotting wurde die Nitrocellulosemembran mit Ponceau S-Lösung zwecks Proteinfixierung und -färbung behandelt wie oben beschrieben. Danach wurde die Membran 15 min mit 5% Milchpulver (in PBS-Puffer) blockiert. Es folgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper in der geeigneten Verdünnung in 2 % Milchpulver in PBS ÜN bei 4 °C. Es schloss sich ein Waschschrift mit PBS-Puffer an (1 x schnell und 3 x 10 min in PBS + 0,05% Tween). Die nun folgende Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Peroxidase-markiert) wurde bei RT für ein bis zwei Stunden durchgeführt. Anschließend wurde die Membran wieder mit PBS-Puffer + 0.05 % Tween gewaschen (erneut 1 x schnell und 3 x 10 min). Abschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS ohne Tween-Zugabe, um eine Inhibierung der Peroxidasereaktion zu vermeiden. Die Membran wurde dann mit ECL-Reagenz für 1 min inkubiert. Anschließend wurde sie in eine Photokassette überführt und mit Klarsichtfolie überspannt. Es folgte die Belichtung eines Röntgenfilms durch Auflegen auf die Membran und abschließend die maschinelle Entwicklung.

Lösungen:

- ECL-Reagenz	2,5 ml	ECL1
	2,5 ml	ECL 2

IV.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung diente der Überprüfung des Leserasters und der Mutationsfreiheit nach Klonierungen, sowie der Analyse der gewonnen Two-Hybrid-Klon-DNA. Sie erfolgte nach der von Sanger entwickelten Kettenabbruchsmethode. Dabei werden zur Sequenzierung DNA-Polymerasen eingesetzt, denen als Substrat neben den 2'-Desoxynukleotid-Triphosphaten (dNTPs) auch 2'-3'-Dideoxy-Nukleotid-5'-Triphosphate (ddNTPs) zur Verfügung gestellt werden. Zur Synthese muss der abzulesende DNA-Strang (Matrize) einzelsträngig vorliegen, an den sich ein Primer komplementär anlagert. Am 3'-Ende des Primers werden durch eine DNA-Polymerase dNTPs eingebaut. Der Einbau eine ddNTPs bewirkt einen Kettenabbruch der Synthese.

Statistisch kommt es dabei an jedem Nukleotid der Matrize zu Kettenabbrüchen, so dass ein Gemisch verschieden langer DNA-Sequenzen entsteht. Die *Taq*-Polymerase kommt zum Einsatz, weil sie mehrere Denaturierungszyklen erlaubt und damit auch bei geringer Matrizenmenge durch ihre hohe Effizienz ein Signal detektierbar wird.

Der in dieser Arbeit verwandte Sequenzkit enthielt sogenannte BigDYE-Terminatoren, das sind ddNTPs, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Ihre Absorptionsspektren unterscheiden sich soweit voneinander, dass sie bei Anregung durch Bestrahlung mit einem 488 nm-Argon-Laser und geeigneter Filterung vier photometrisch eindeutig erfassbare Einzelsignale ergeben. Das benutzte Kit enthält alle notwendigen Komponenten: markierte ddNTPs, unmarkierte dNTPs, eine *AmpliTaq*-Polymerase und den geeigneten Reaktionspuffer.

IV.5.1 Probenvorbereitung

IV.5.1.1 Sequenzreaktion

Die Probenvorbereitung unterschied sich für Plasmide und PCR-Produkte. Die eingesetzte DNA-Menge betrug bei PCR-Produkten 40 ng und bei Plasmiden 300 - 500 ng. Die Bestimmung der Menge erfolgte photometrisch nachdem die DNA mit Hilfe einer Säulenpräparation aufgereinigt worden war. Als weitere Komponente kam der geeignete Primer zum Einsatz in einer Konzentration von 3,2 pmol für PCR-Produkte und 6,4 pmol für Plasmide. Außerdem wurde 4 µl Sequenzkit für PCR-Produkte und die doppelte Menge für Plasmide zugefügt. Letztendlich wurde der Sequenzansatz auf 10 µl bei PCR-Produkten und 20 µl für Plasmide mit HPLC-H₂O aufgefüllt. Das Sequenzprogramm setzte sich folgendermaßen zusammen:

<u>Initiale Denaturierung:</u>		95 °C	2 min
<u>PCR-Zyklus:</u>	Denaturierung	95 °C	20 sec
	Hybridisierung	xx °C	15 sec
	Elongation	60 °C	1 min

es wurden 28 Zyklen durchlaufen,
die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils optimiert.

IV.5.1.2 Aufreinigung der Sequenzreaktion

Falls notwendig wurden die Sequenzreaktionen auf 20 µl mit HPLC-H₂O aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 2 µl Na-Acetat-EDTA (im Kit enthalten) und von 80 µl absolutem Ethanol. Die Mischung wurde gründlich gevortext. Danach erfolgte eine Inkubation bei RT für 20 min. Die Lösung wurde dann für 15 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Als Waschschrift wurden 300 µl 70 %iger Ethanol zugegeben und erneut bei 1400 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt. Nach Lufttrocknung des Pellets konnte es in Auftragspuffer gelöst werden oder bei -20 °C für ca. einen Monat gelagert werden.

IV.5.2 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des ABI 377-Systems. Zunächst erfolgte die Herstellung eines Polyacrylamid-Harnstoff-Gels. Während der Lösung der Gelmischung wurden die Glasplatten der Gießvorrichtung sorgfältig gereinigt. Anschließend wurde die Gießvorrichtung zusammengebaut und durch Zugabe von APS und TEMED die Gel- Polymerisation induziert. Die Polymerisation sollte mindestens 1 h andauern, dann wurde der Kamm ca. 1 mm weit in das Gel gesteckt und die Glasplatten wurden noch einmal sorgfältig gesäubert, v. a. im Bereich des Leserahmens. Das Gel wurde dann mit dem Gelrahmen in das eigentliche Sequenziergerät eingesetzt. Die Software wurde parallel dazu gestartet: ABI-prism 377-96 Collect und ein neuer Sequenzlauf angewählt. Es folgte der softwaregesteuerte Platten-Check, der anzeigt, ob noch Verschmutzungen im Lesebereich sind. War dies nicht der Fall, wurden die Pufferkammern eingesetzt und mit 1 x TBE befüllt. Die Heizplatte wurde eingesetzt und die Gerätetemperatur auf 51 °C erhöht. Während des Aufheizens (ab ca. 48°C) konnte das Gel bereits beladen werden. Nachdem die Proben in das Gel eingelaufen waren konnte der Kamm gezogen werden und der Sequenzlauf beginnen. Die Lesezeit richtete sich nach der Zahl der Basenpaare, es wurden ca. 100 bp pro Stunde analysiert. Bei Plasmidsequenzierungen erfolgte der Lauf stets über Nacht.

Die Auswertung der Proben erfolgte mit Hilfe der ABI Prism-Software, manuell optimiert wurden der Gelkontrast, die maximale Peak-Höhe, die Lage der Extraktionslinien, Beginn und Ende des Leserahmens und das Spacing der Nukleotide.

Lösungen:

<u>Gellösung:</u>	18 g	Harnstoff
	26 ml	H ₂ O
	5 ml	10 x TBE

Lösen im 50 °C-Wasserbad, dann auf 37 °C abkühlen

Zugabe:	5 ml	Long Ranger Gel Solution
---------	------	--------------------------

Filtration durch < 0,45 µm-Spritzenfilter

Polymerisation:	250 µl	APS
	35 µl	TEMED

V Ergebnisse

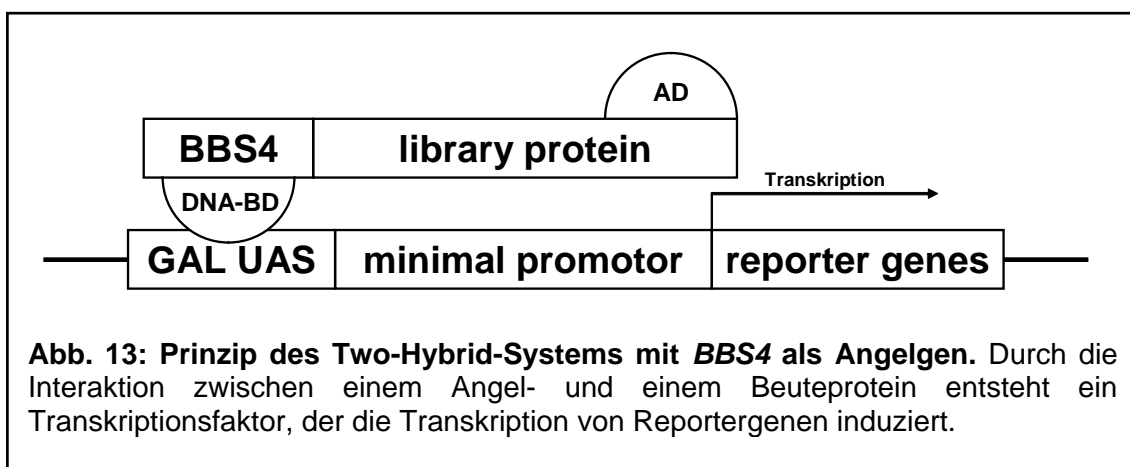
V.1 „Two-Hybrid-Screen“ mit BBS4

V.1.1 Prinzip des Two-Hybrid-Screens

Dieser Arbeit wurde die Analyse von Proteininteraktionen zwischen den BBS-Produkten untereinander und mit anderen humanen Proteinen als Ziel gesetzt. Dabei fand insbesondere eine Fokussierung auf das Protein BBS4 statt. Ein Yeast-Two-Hybrid-Screen diente der Auffindung von Protein-Protein-Interaktionen (Abb. 13). Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Proteine als Fusionsproteine exprimiert. Man unterscheidet zum einen das Angelgen, dessen Produkt auf Interaktionen getestet werden soll, und zum anderen das Beutegen, dessen Produkt zur Interaktion angeboten wird. In Two-Hybrid-Screens kommt meist eine Genbibliothek zur Anwendung, die zahlreiche Beutegene enthält, so dass viele Interaktionen überprüft werden können. Das Angelgen wird auf einem *CEN TRP1*-Plasmid als Fusion mit einer Gal4-DNA-Bindungsdomäne exprimiert, das Beutegen wird auf einem *CEN LEU*-Plasmid mit einer Gal4-DNA-Aktivierungsdomäne exprimiert. Beide Fusionsproteine stehen unter Kontrolle des konstitutiven *ADHI*-Promotors. Die Termination der Transkription erfolgt an einem T7 und einem *ADHI* Transkriptions-Termination-Signal. Findet eine Interaktion zwischen dem Beute- und dem Angelprotein in einem Hefereporterstamm statt, gelangt die Aktivierungsdomäne in engen räumlichen Kontakt zu der DNA-Bindungsdomäne. Dann entsteht die dreidimensionale Struktur eines klassischen Transkriptionsfaktors. Dieser Faktor kann an das genomische Gal-UAS-Element des Hefe-Reporterstamms binden, das einem Minimal-Promotor vorgeschaltet ist, unter dessen Kontrolle verschiedene Reportergene stehen. Durch die Bindung des Transkriptionsfaktors wird also letztlich die Transkription der Reportergene aktiviert. Diese Gene codieren zum einen für die Adenin und Histidin, so dass die Stämme, in denen Interaktionen stattfinden, auf Selektionsmedien wachsen können. Getestet wird das Wachstum von Kolonien auf sogenannten Quadrupel-Dropout-Platten (QDO), in denen die Aminosäuren Histidin, Leucin und Tryptophan und die Nukleotidbase Adenin depletiert sind. Auf diesen Platten wachsen nur Zellen, in denen eine Interaktion stattfindet. Zum anderen gehört das *lacZ*-Gen ebenfalls zu den Reportergenen, so dass

zur Bestätigung der Wachstumstests ein lacZ-Test vorgenommen werden kann. Die Ergebnisse der Tests wurden jeweils mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle verglichen. Als Positivkontrolle dient ein Hefestamm, der als Beuteprotein p53 und als Angelprotein das LargeT-Antigen enthält. Als Negativkontrolle fungiert ein Stamm mit dem gleichen Beuteprotein und LaminC als Angelprotein.

Die Bedingungen zur Interaktion der Proteine in *S.cerevisiae* können auf zwei Wegen hergestellt werden: Durch Kotransformation der Plasmide in einen Hefestamm oder durch Kreuzung der jeweils ein Plasmid enthaltenden Hefestämme.



V.1.2 Eigenschaften der Genbibliothek

Zur Anwendung kam die käuflich erwerbbare (Clontech, Heidelberg) mRNA-Genbibliothek aus menschlicher Niere, die in den Hefestamm Y187 prätransformiert wurde. Als Klonierungsvektor diente pACT2 (s. Material und Methoden), welcher mit den Restriktionsenzymen *XhoI/EcoRI* verdaut wurde. cDNAs der Länge 0,5-4 kb wurden amplifiziert und kloniert über eine *EcoRI-NotI-SalI*-Adaptor-Sequenz und einen *XhoI*-(dT)₁₅-Primer. In der Bibliothek waren $3,5 \times 10^6$ unabhängige Klone enthalten. Die Wahl fiel auf diese Bibliothek, weil eine Expression der BBS-Proteine in der menschlichen Niere nachgewiesen worden war (Mykityn *et al.*, 2001), und demzufolge hier auch Protein-Interaktionen zu erwarten sind, zumal die Niere zu den am stärksten betroffenen Organen der BBS-Patienten gehört.

V.1.3 Vorarbeiten zur Durchführung des Two-Hybrid-Screens

Das *BBS4*-Gen sollte sowohl in den Beute- als auch in den Angelvektor kloniert werden, denn es sollte nicht nur der Screen mit der Genbibliothek durchgeführt werden, sondern auch direkte Interaktionstests gemacht werden. Eine kurze Charakterisierung der Yeast-Two-Hybrid-Vektoren findet sich in Tab. 6.

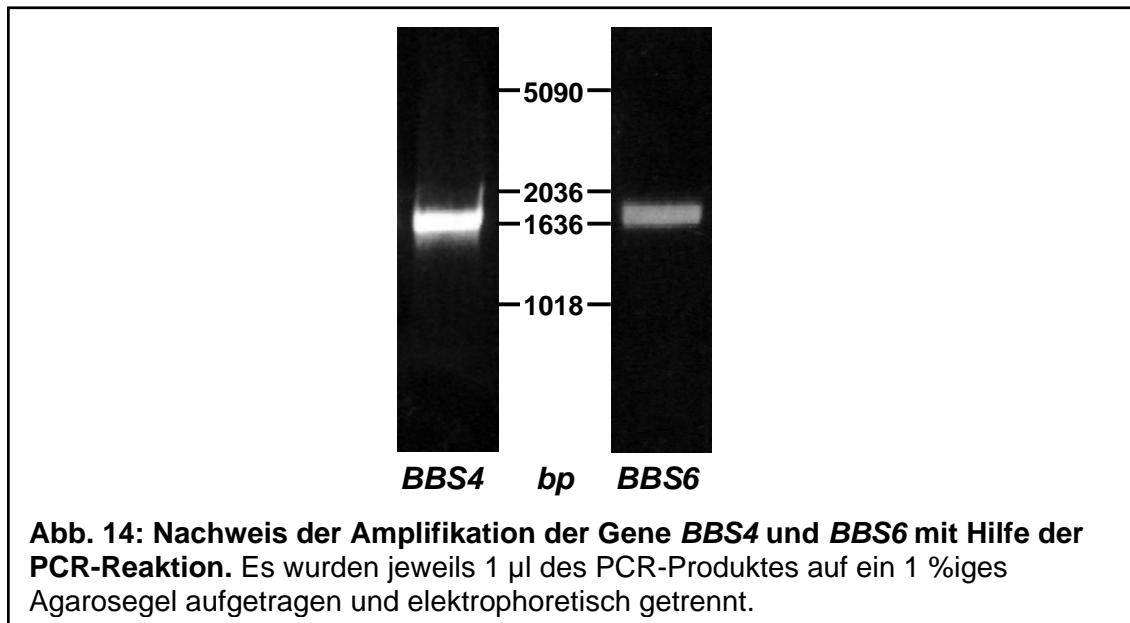
Tab. 6: Eigenschaften der Two-Hybrid-Vektoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden.				
Klonierungs-vektor	Fusion	Epitop	Hefeselektion	Bakterien-selektion
PGBKT7	DNA-BD/Angel	c-Myc	<i>TRP1</i>	Kanamycin
PGADT7	DNA-AD/Beute	HA	<i>LEU2</i>	Ampicillin

V.1.3.1 PCR und Klonierung

An erster Stelle stand die notwendige Amplifikation der Gen-DNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion. Zu diesem Zweck mussten genspezifische Primer konstruiert werden, die gleichzeitig eine Schnittstelle für ein geeignetes Restriktionsenzym enthalten sollten. Die Auswahl der Restriktionsenzyme erfolgte so, dass jeweils nur eine spezifische Schnittstelle im Vektor und eine im Primer vorlag. Aus dieser Überlegung heraus erwiesen sich die Enzyme *EcoR1/BamH1* für die Klonierung von *BBS4* in beide Vektoren und *EcoR1/Xho1* für *BBS6* in den Vektor pGADT7 als geeignet. Die Primer bestanden aus jeweils 24-27 zum jeweiligen Gen komplementären Nukleotiden, der Nukleotidsequenz für das Restriktionsenzym und einem Überhang von sechs weiteren Basen, die eine Anlagerung des Restriktionsenzym gewährleisten sollten. Die errechneten Schmelztemperaturen der Primer nach der G/C-Regel lagen zwischen 55 und 60 °C.

Im nächsten Schritte erfolgte die Amplifikation der Gene *BBS4* und *BBS6* mit Hilfe der PCR wie es im Kapitel Material und Methoden beschrieben ist. Als Matrize diente cDNA, die mit Hilfe der reversen Transkriptase komplementär zu mRNA aus der menschlichen Niere synthetisiert worden war (s. Material und Methoden). In der mRNA der Niere sollte die mRNA der *BBS*-Gene enthalten sein, da deren Expression in der menschlichen Niere gezeigt worden war (Mykytyn *et al.*, 2001). Nach der Optimierung

der PCR-Parameter konnten die Gene *BBS4* und *BBS6* spezifisch amplifiziert werden (Abb. 14).



Es folgte die Aufreinigung der PCR-Produkte, der Restriktionsverdau selbiger sowie der des Vektors, ein erneuter Aufreinigungsschritt und die Ligation der *BBS*-Gene in die entsprechenden Zielvektoren (zu Einzelheiten s. Material und Methoden).

V.1.3.2 Sequenzanalyse der Klonierungsprodukte

Mit den Klonierungsprodukten pGBKT7-*BBS4*, pGADT7-*BBS4* und pGADT7-*BBS6* wurden *E.coli*-Bakterien transformiert, aus ihnen wurden die Plasmide isoliert und aufgereinigt. Die Plasmide wurden zur Sequenzierung verwandt. So sollte sichergestellt werden, dass die Klonierung der *BBS*-Gene „*in-frame*“ erfolgt war und dass die Wildtyp-Sequenz der Gene vorliegt. Die Plasmide, die diese Kriterien erfüllten, wurden zur weiteren Verwendung ausgewählt.

V.1.3.3 Transformation der Two-Hybrid-Hefestämme

Mit den erhaltenen Konstrukten wurden die Two-Hybrid-Hefestämme AH109 (= Angelstamm) und Y187 (= Beutestamm) transformiert, die für die Durchführung des Screens und der direkten Tests geeignet waren. Die Plasmide unterscheiden sich nicht nur in der Information für die Fusionsproteine, sondern auch in den Genen für die

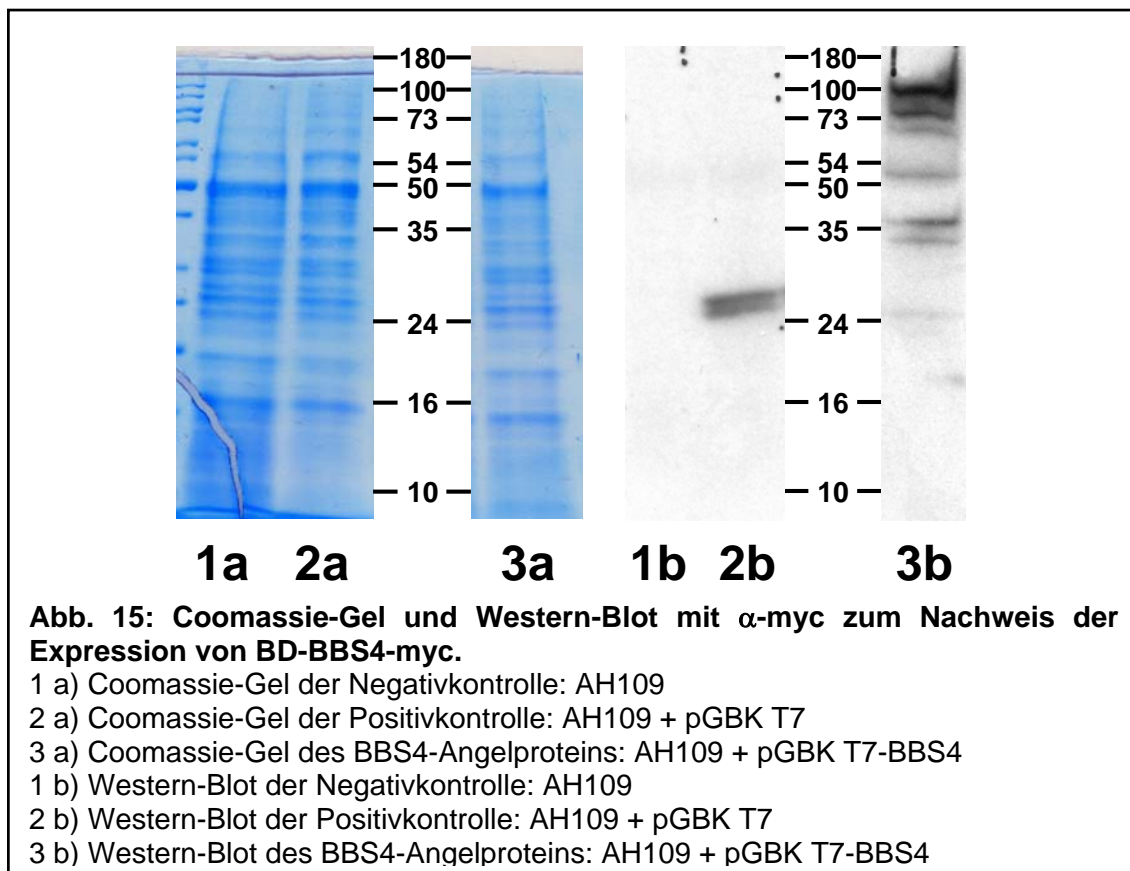
Antibiotikaresistenz, für die Expression einer Aminosäure und für die zweite Fusionskomponente. Auf diese Weise ist gewährleistet, dass sie auch bei gleichzeitigem Einsatz immer einzeln selektiert werden können.

V.1.3.4 Durchführung eines Western-Blots für BBS4

Es sollte nachgewiesen werden, dass nicht nur die genetische Information auf den Plasmiden enthalten war, sondern dass das BBS4-Angelprotein funktionell exprimiert wird.

Das pGBKT7-BBS4 Plasmid enthält nicht nur die Information für die DNA-Bindungs-Domäne in Fusion mit *BBS4*, sondern codiert im C-terminalen Leseraster auch für eine Myc-Domäne. Das Molekulargewicht des Expressionsproduktes berechnet sich aus dem Molekulargewicht von BBS4 und den Gewichten der Fusionsdomänen. So ergab sich ein erwartetes Gesamtgewicht von 73 kDa für das BBS4-Angelprotein. Es wurde ein 10 %iges SDS-Gel zur Auftrennung der Proben verwandt, und nach der Inkubation mit dem α -Myc-Antikörper als Erstantikörper und dem α -Maus-Antikörper als Zweitantikörper ließen sich die erhofften Banden detektieren. Als Positivkontrolle diente der Stamm AH109 mit dem pGBKT7-Plasmid, auf dem ein Fusionsprotein aus der DNA-Bindedomäne und c-myc codiert wird (Größe: 22 kDa). Als Negativkontrolle diente der Stamm AH109 ohne Plasmid. Mit Hilfe der Coomassie-Färbung wurde nachgewiesen, dass Proteine exprimiert und aufgereinigt wurden und gleiche Mengen Protein auf das Gel aufgetragen wurden (Abb. 15).

Mit diesem Versuch wurde bestätigt, dass die Proteine ordnungsgemäß exprimiert wurden. Es zeigte sich allerdings, dass in der Spur mit dem BBS4-Protein mehrere kleinere Banden detektierbar waren. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Abbauprodukte, die entweder in der Hefe selbst entstehen oder bei der Aufreinigung der Proteine. Da das intakte BBS4-Produkt aber überwog, konnte ein Two-Hybrid-Screen durchgeführt werden.



V.1.3.5 Test auf unspezifische transkriptionelle Aktivierung

Durch diesen Test sollte ausgeschlossen werden, dass eine transkriptionelle Aktivierung der Reportergene durch die BBS4-DNA-Bindungsdomänen-Fusionsproteine stattfindet, solange nicht eine tatsächliche Interaktion stattgefunden hat. Dies könnte geschehen, falls die räumliche Konformation des BBS4-DNA-BD-Domäne-Proteins der eines Transkriptionsfaktors ähnelt. Um dies zu testen, wurde eine Zellsuspension der mit pGBKT7-*BBS4* transformierten Stämme AH109 und Y187 auf selektive Platten aufgetropft:

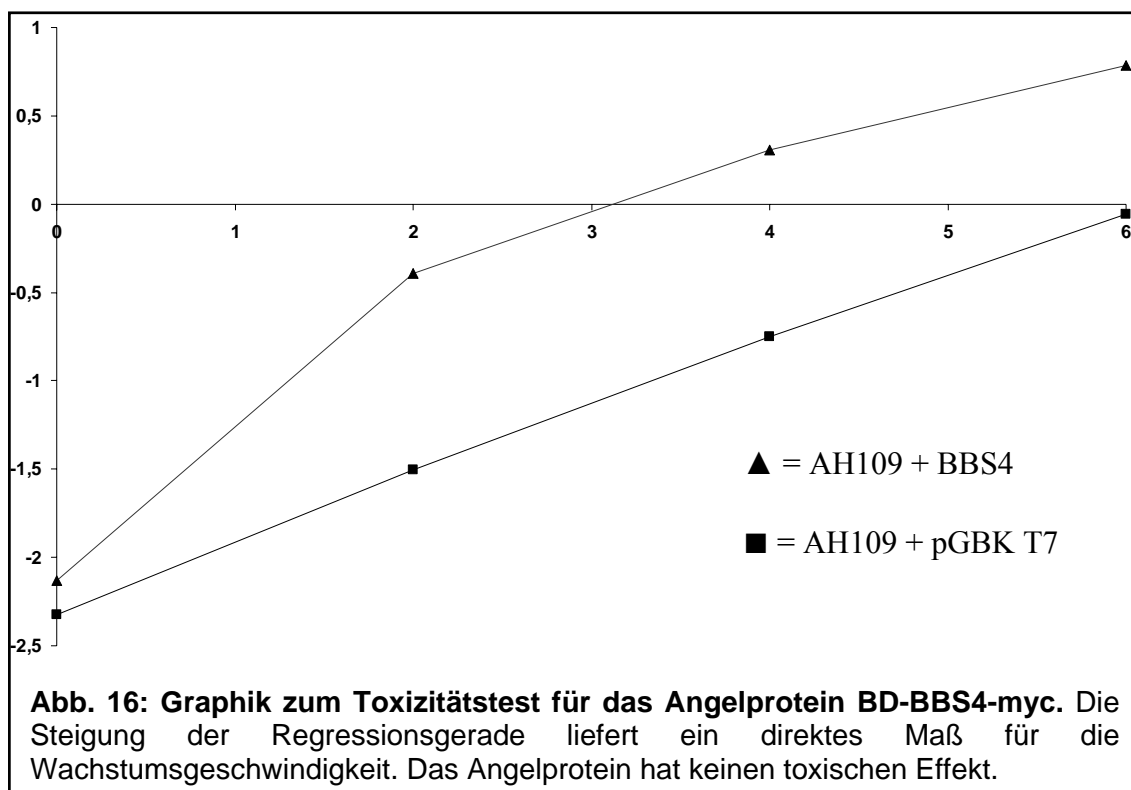
- SD/-Trp
- SD/-His/-Trp
- SD/-Ade/-Trp

Auf den -Trp-Platten sollten die Zellen wachsen, denn diese Platten selektieren nur auf das Vorhandensein des Plasmids. Auf den anderen Platten sollten die Zellen kein Wachstum zeigen, denn sonst würde das auf eine unspezifische

Transkriptionsaktivierung hindeuten. Dies war aber nicht der Fall, so dass das Konstrukt für die Durchführung eines Two-Hybrid-Screens einsetzbar war.

V.1.4 Test auf Toxizität der Konstrukte

Es bestand die Möglichkeit, dass die Expression des Fusionsproteins unter Kontrolle des konstitutiven ADH1-Promotors toxisch für das Zellwachstum ist. Je nach Ausmaß der Toxizität ist dies problematisch für die Durchführung eines Two-Hybrid-Screens, denn viele Interaktionen könnten aufgrund der erhöhten Mortalität der Zellen nicht detektierbar sein. Die Durchführung des Tests bestand in der Erstellung einer Wachstumskurve des Angelstammes (AH109), der mit dem leeren Klonierungsvektor (pGBKT7) und mit dem *BBS4* enthaltenen Beutevektor (pGBKT7-*BBS4*) transformiert worden war. Die Zellen wurden bei 25 °C inkubiert. Die OD₆₀₀ der Zellsuspensionen wurde alle zwei Stunden ermittelt. Der Logarithmus zur Basis zwei wurde errechnet und somit die Exponentialfunktion des Wachstums auf eine lineare Funktion zurückgeführt. Die Steigung der Regressionsgerade dieser linearen Funktion liefert ein direktes Maß für das Wachstum (Abb. 16).



Es ergaben sich folgende Werte: Ein Steigungskoeffizient von 0,47 für AH109 mit pGBKT7-*BBS4* und 0,37 für AH109 mit pGBKT7. Das Wachstum der Hefezellen wird also durch das BBS4-Fusionsprotein keineswegs eingeschränkt, so dass sich auch aus diesem Ergebnis die Eignung für einen Two-Hybrid-Screen ergibt.

V.1.4.1 Ermittlung der Mating-Effizienz

Der Two-Hybrid-Screen mit BBS4 sollte durch Mating des Angelstammes (AH109 mit pGBKT7-*BBS4*) mit dem die Genbibliothek tragenden Stamm Y187 erfolgen. Aus diesem Grunde musste zuvor sichergestellt werden, dass die Expression des BBS4-Fusionproteins keinen negativen Einfluss auf die Mating-Effizienz hat, sie sollte mindestens 2 % betragen. Zur Berechnung der Mating-Effizienz wird zunächst ermittelt, welcher der eingesetzten Hefestämme der limitierende Partner ist. Dazu wird die Viabilität der Hefestämme berechnet, die definiert ist als der Anteil der koloniebildenden Einheiten (cfu) pro Volumeneinheit. Nach dem Mating wird dann das Verhältnis der diploiden Kolonien zu der Anzahl der koloniebildenden Einheiten des limitierenden Partners bestimmt. Diese Berechnung liefert die Mating-Effizienz.

Es wurden folgende Matings im kleinen Maßstab durchgeführt:

1) sY187 + pTD1 x sAH109 + pGBK T7 als Kontrolle

2) sY187 + pTD1 x sAH109 + pGBK T7/*BBS4*

zur Überprüfung des Einflusses von BBS4

Es ergaben sich folgende Ergebnisse: Der limitierende Partner war in beiden Fällen Y187 + pTD1. Für 1) ergab sich eine Mating-Effizienz von 6,6 % und für 2) 3,1 %. Daraus ist zu schließen, dass BBS4 durchaus einen negativen Effekt auf die Mating-Effizienz zu haben scheint. Aber der Grenzwert von 2 % wird dennoch deutlich überschritten. Auch dieses Ergebnis erlaubt also die Durchführung eines Two-Hybrid-Screens.

Aus den Vorarbeiten konnte insgesamt das Fazit gezogen werden, dass der Durchführung eines Two-Hybrid-Screens mit BBS4 nichts im Wege stand.

V.1.5 Durchführung des Two-Hybrid-Screens

Der Two-Hybrid-Screen beruht darauf, dass die genetische Information des Angel- und des Beuteplasmids nebeneinander exprimiert wird und die entstehenden Proteine die

Möglichkeit haben zu interagieren. Dies kann zum einen durch eine Kotransformation der Plasmide in einen Hefestamm geschehen oder durch die Kreuzung zweier jeweils ein Plasmid enthaltender Stämme. In dieser Arbeit wurde letzteres durchgeführt. Die Kreuzung zwischen dem Angelstamm AH109 mit pGBKT7-*BBS4* und dem Stamm Y187 mit der Genbibliothek in pACT2 erfolgte für 24 Stunden bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C in 2xYPDA/Kan-Medium, das besonders reich an nutritiven Faktoren ist. Daran schlossen sich verschiedene Waschschrte und die Bestimmung des Volumens der Zellsuspension (12 ml) sowie die Ausplattierung der Zellen an. Um die Ausbeute des Two-Hybrid-Screens kalkulieren zu können, musste die Kreuzungs-Effizienz bestimmt werden.

Außerdem sollte herausgefunden werden, ob der Beutestamm oder der Angelstamm der limitierende Faktor war; optimalerweise sollte dies der Stamm sein, der die Genbibliothek enthielt, denn dann war anzunehmen, dass die meisten Proteine der Bibliothek einen Partner gefunden hatten und somit der Screen gesättigt war.

Zur Kalkulation der genannten Parameter wurden jeweils 100 µl einer 1:10; 1:100; 1:1.000; 1:10.000-Verdünnung der Zellsuspension auf folgende Platten ausplattiert:

- SD/-Leu
- SD/-Trp
- SD/-Leu/-Trp

Die übrige Zellsuspension wurde zu je 200 µl auf 53 140-mm QDP-Platten plattiert. Alle Platten wurden anschließend für sechs Tage bei 30 °C inkubiert, bis deutlich sichtbar Kolonien gewachsen waren.

Die Zahl der Kolonien (= colonies forming units = cfu) auf den SD-Platten wurde ermittelt und ein Mittelwert für jeweils eine Art von SD-Platten kalkuliert. Durch folgende Berechnung konnte dann die Viabilität (Lebensfähigkeit) der Kreuzungs-Partner und der diploiden Zellen ermittelt werden:

$$\text{Viabilitätsberechnung: } \frac{\text{Cfu}}{\text{Plattiertes Volumen [ml]} \times \text{Verdünnungsfaktor}} = \text{lebende Cfu/ml}$$

Lebende cfu/ml auf SD/-Trp: = „Viabilität“ von AH109 mit *BBS4* (Angel), haploid

Lebende cfu/ml auf SD/-Leu: = „Viabilität“ von Y187 mit Bibliothek (Beute), haploid

Lebende cfu/ml auf SD/-Leu/-Trp: = „Viabilität“ der diploiden Zellen

Zur Berechnung der Kreuzungs-(Mating-)Effizienz diene folgende Formel:

$$\text{Mating-Effizienz: } \frac{\text{Lebende Cfu/ml diploide Zellen} \times 100}{\text{Lebende Cfu/ml limitierender Partner}} = \% \text{ diploid}$$

Aufgrund der gezählten Klone und der Durchführung der genannten Berechnungen ergaben sich die in Tab. 7 gezeigten Werte.

Tab. 7: Übersicht über die ermittelten Viabilitätsparameter aufgrund der auf den Testplatten gezählten Kolonien.

Viabilität des Beutestamms	Viabilität des Angelstamms	Viabilität der Diploiden Zellen	% diploide Zellen
$2,02 \times 10^7$ cfu/ml	$1,41 \times 10^8$ cfu/ml	$6,1 \times 10^6$ cfu/ml	30,2

Schließlich konnte die Zahl der gescreenten Klone errechnet werden:

Lebende Cfu/ml diploide Zellen x Zellsuspensionsvolumen = Zahl der gescreenten Klone

Die Zahl der gescreenten Klone war $7,3 \times 10^7$.

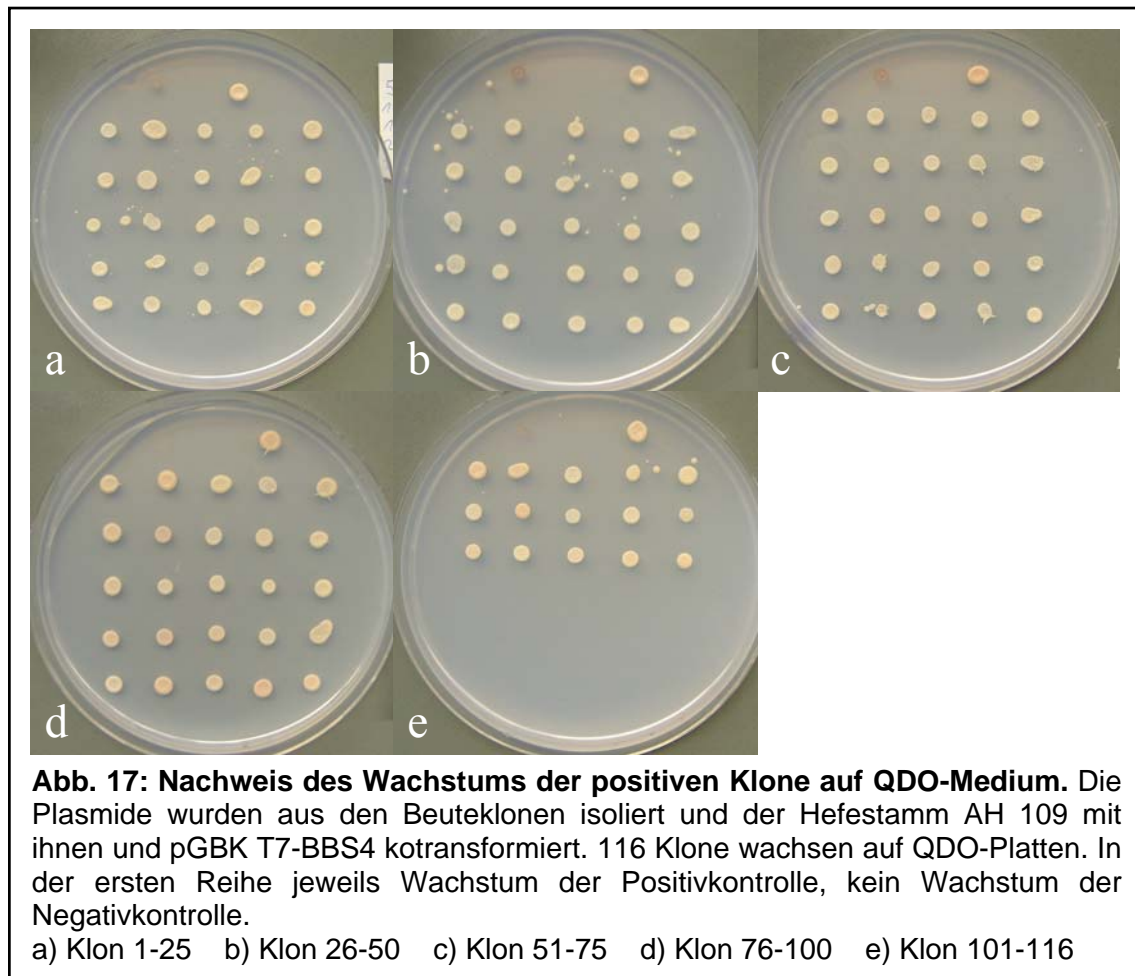
Daraus lässt sich ablesen, dass der Hefestamm Y187, der die Genbibliothek enthielt, eindeutig der limitierende Partner war, denn die Viabilitätsparameter der Stämme differieren um eine Zehnerpotenz zugunsten des Angelstamms. Der Prozentsatz der diploiden Zellen ist auch deutlich ausreichend, er sollte mindestens 2 % erreichen, was signifikant überschritten wurde. Die Zahl der gescreenten Klone ist mit $7,3 \times 10^7$ auch deutlich größer als die Zahl der unabhängigen Klone in der Genbibliothek mit 2×10^6 . Die in der Bibliothek enthaltende genetische Information ist also mehrfach gescreent worden.

V.1.6 Auswertung der positiven Klone

Auf den 53 140mm-QDP-Platten war bereits nach drei Tagen ein deutliches Zellwachstum festzustellen; sie wurden trotzdem noch drei weitere Tage bei 30 °C inkubiert, um zu gewährleisten, dass auch langsamer wachsende Klone nicht verloren gehen konnten. Die Zahl der Kolonien pro Platte variierte zwischen eins und vier, so dass sich insgesamt eine Anzahl von 120 positiven Klonen ergab. Die Klone wurden in Glycerolstocks bei -80 °C gelagert.

V.1.7 Verifizierung der positiven Klone

Es ist gezeigt worden, dass sich in Two-Hybrid-Screens relativ häufig falsch-positive Interaktionen finden lassen (Munder *et al.*, 1997). Daher sollte bewiesen werden, dass die gefundenen Klone tatsächlich Träger positiver Interaktionen waren. Zu diesem Zweck wurde eine Kotransformation der gefundenen Beuteplasmide zusammen mit dem *BBS4*-codierenden Angelplasmid in den Stamm AH109 durchgeführt. Anschließend wurde das Wachstumsverhalten dieser Zellen auf QDO-Platten geprüft sowie ein *lacZ*-Test mit diesen Zellen durchgeführt. Um die Angelplasmide für die Kotransformation zu gewinnen, mussten diese aus den positiven Hefeklonen isoliert werden. Dies geschah durch die Anzucht der positiven Klone in selektivem -Leu-Flüssigmedium und anschließender Plasmidpräparation aus den Hefekulturen. *E. coli* wurde mit den so gewonnenen Plasmiden durch Elektroporation transformiert, die Plasmide isoliert und zusammen mit dem *BBS4*-Angelplasmid in AH109 rücktransformiert. Anschließend wurden mit diesen Klonen die genannten Tests durchgeführt. Es ließen sich insgesamt 115 Klone als tatsächlich positiv bestätigen (Abb. 17 und 18).



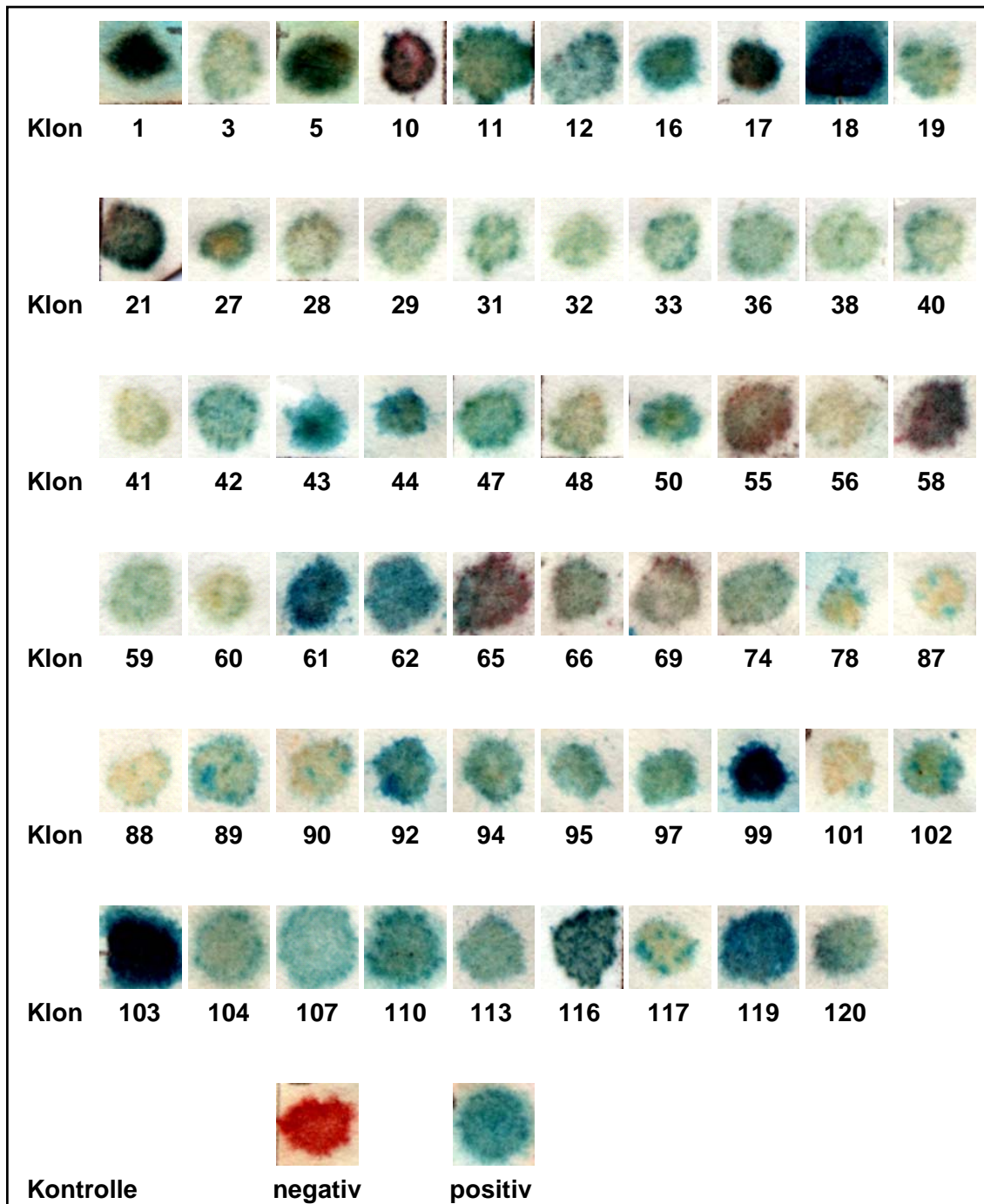


Abb. 18: Filter-lac-Z-Test der positiven Klone. Die Plasmide wurden aus den Beuteklonen isoliert und der Hefestamm AH 109 mit ihnen und pGBK T7-BBS4 kotransformiert. Positive Klone, aus denen das gleiche Beuteprotein isoliert wurde, sind jeweils nur einmal dargestellt.

V.1.8 Falsifizierung der falsch-positiven Klone

Die positiven Ergebnisse konnten auch auf unspezifischen Interaktionsreaktionen beruhen, die bei Two-Hybrid-Screens häufig sind. Um dies auszuschließen, wurden die Beuteplasmide der positiven Klone einer weiteren Kotransformation unterzogen. In diesem Falle wurden die Beuteplasmide kotransformiert mit Angelplasmiden, die für p53 codierten. Auch hier wurden die Zellen zunächst auf –Leu/-Trp-Platten selektiert und dann beiden Tests - dem Wachstumstest und dem lacZ-Test - unterzogen. Ergab sich auch hier ein positives Ergebnis, so war anzunehmen, dass die Interaktion mit BBS4 nicht spezifisch war, sondern dass das gefundene Angelprotein eine generell hohe Affinität zu anderen Proteinen besaß. Die falsch positiven Klone wurden verworfen. Es wurden 12 falsch positive Klone identifiziert; einer dieser Klone hatte auch kein positives Ergebnis im lacZ-Test mit BBS4 ergeben.

Auf diese Weise ergaben sich durch die sukzessive Selektion der spezifischen positiven Klone folgende Ergebnisse:

3 x 10 ⁷	gescreente Klone
120	gewachsene Klone
120	retransformierte Klone
116	Klone wurden als positiv verifiziert
14	Klone erwiesen sich als falsch positiv (eine Überschneidung)
102	Klone waren spezifisch positiv für eine Interaktion mit BBS4

V.1.9 Sequenzierung und Identifizierung der positiven Klone

Die Interaktionspartner von BBS4, die sich in den Tests bestätigt hatten, sollten identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden die aus *E.coli* isolierten gereinigten Beuteplasmide sequenziert. Als Primer diente der *Gal4*-AD-Sequencing-Primer.

Die gewonnen Sequenzen wurden identifiziert durch einen Abgleich mit der BLAST-Datenbank (link s. III.11). Zur weiteren Charakterisierung der BBS4-Interaktoren wurde überprüft, ob Informationen über die gefundenen Proteine in der OMIM (online Mendelian Inheritance in men)-Datenbank (link s. III.11) vorliegen. Dort finden sich

Informationen über Fehlbildungen und Krankheiten, an denen die Beuteproteine möglicherweise beteiligt sind.

V.1.9.1 BLAST-Ergebnisse der positiven Klone

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Sequenzanalysen zur besseren Übersicht tabellarisch dargestellt. Die Nummern der Klone, die durch die beschriebenen Testverfahren ausselektiert wurden, sind nicht aufgeführt. Die Kennzeichnung mit einem „+“ neben der Nummer des Klones zeigt an, dass es OMIM-Informationen für den jeweiligen Klon gibt.

Nr. des Klons	Beutegen	Identifikationsnr.
1+	Short chain L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase	BC000306
3+	Aldolase B, Fructose-Bisphosphatase	NM_000035
4+	Aldolase B, Fructose-Bisphosphatase	NM_000035.2
5+	Homo sapiens methylenetetrahydrofolate dehydrogenase(NADP+dependent)	NM_005956
7+	Aldolase B, Fructose-Bisphosphatase	NM_000035
10	Homo sapiens mRNA for coiled-coil domain 1 protein precursor (MCCD1 gene)	HSA000141
11	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20422	BC005210
12+	Pericentriolar material 1	NM_006197
13+	Aldolase B, Fructose-Bisphosphatase	NM_000035.2
15+	Aldolase B, Fructose-Bisphosphatase	NM_000035.2
16	Homo sapiens chromosome 5 clone CTD-2589H19	AC026740
17+	Homo sapiens endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1)	NM_001430
18 +	Homo sapiens placental protein 6	BC011948
19	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20422	BC005210
21+	Homo sapiens aminoacylase 1 (ACY1)	NM_000666
24+	Pericentriolar material 1	NM_006197
25+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035

26+	Pericentriolar material 1	NM_006197
27+	Homo sapiens, Similar to catalase	BC027300
28	Homo sapiens genomic DNA, chromosome 11q, clone:RP11-452H21	AP003086
29+	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon	BC000490
30+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
31	Homo sapiens hypothetical protein MGC35048	BC034823
32	Homo sapiens hypothetical protein MGC35048	BC034823
33+	Homo sapiens flotillin 1 (FLOT1)	NM_005803
34	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
35	Homo sapiens endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1)	BC051338
36	Homo sapiens cDNA FLJ13763 fis, clone PLACE4000089	AK023825
37+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
38+	Homo sapiens death-associated protein kinase 1 (DAPK1)	NM_004938
39+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
40+	Homo sapiens dynactin 1	NM_023019
41	Homo sapiens nasopharyngeal carcinoma related protein	BC043384
42	Homo sapiens chromosome 18, clone RP11- 504I13, complete sequence	AC009716
43	Homo sapiens mRNA for KIAA0785 protein, partial cds	AB018328
44+	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex	BC007509
45+	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon	BC000490
46+	Homo sapiens eukaryotic translation initiation	BC000490

	factor 3, subunit 5 epsilon	
47+	Homo sapiens COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit	BC002520
48+	Homo sapiens junction plakoglobin (JUP), transcript variant 2	NM_021991
49+	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon	BC000490
50+	Homo sapiens 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2a	NM_016821
51+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
52+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
54+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
55	Homo sapiens KIAA0058 mRNA, partial cds	D31767
56	Homo sapiens KIAA0058 mRNA, partial cds	D31767
57+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
58+	Homo sapiens calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha (CALCA)	NM_001741
59+	Homo sapiens actin beta (ACTB)	NM_001101
60	Homo sapiens hypothetical protein LOC283820, mRNA (cDNA clone IMAGE:3841946), partial cds	BC006531
61+	Homo sapiens tetratricopeptide repeat protein 4 (TTC4) mRNA, complete cds	AF073887
62	Human DNA sequence from clone RP11-159J2 on chromosome 13, complete	AL162571
63+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
64+	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8	BC000490
65+	Homo sapiens golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4 (GOLGA4)	NM_002078

66+	Homo sapiens solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; dicarboxylate transporter), member 10, mRNA	BC007355
67+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
68+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
69+	Homo sapiens ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B, isoform 2 (ATP6V1B2), mRNA	NM_001693
70+	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon	BC000490
71+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
72+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
73+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
74+	Homo sapiens aldolase A, fructose-bisphosphate, transcript variant	BC016800
75+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
76+	Homo sapiens flotillin 1 (FLOT1)	NM_005803
77+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
78	Homo sapiens BAC clone RP11-449P15 from 7, complete sequence	AC073957
79+	Homo sapiens flotillin 1 (FLOT1)	NM_005803
80+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
84	Homo sapiens aldolase A, fructose-bisphosphate, transcript variant	BC016800
85+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
87+	Homo sapiens sterol carrier protein 2 (SCP2)	NM_002979
88+	Homo sapiens sterol carrier protein 2 (SCP2)	NM_002979
89+	Homo sapiens enolase 1 (alpha) (ENO1)	NM_001428
90	Homo sapiens DLNB27 mRNA, complete cds	AB094096
91+	Homo sapiens NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex	BC007509

92	Homo sapiens chromosome 20 open reading frame 116, mRNA	BC011851
93+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
94	Homo sapiens unknown mRNA	AF450485
95	Homo sapiens unknown mRNA	AF450485
97	Homo sapiens unknown mRNA	AF450485
98+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
99+	Homo sapiens DiGeorge syndrome critical region gene 6-like	BC000682
101	Homo sapiens 3q BAC RP11-138N21 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence	AC078986
102+	Homo sapiens mRNA for GANP protein	HSA010089
103	Homo sapiens dual specificity phosphatase-like 15 (DUSP15), transcript variant 2	NM_177991
104	Homo sapiens dual specificity phosphatase-like 15 (DUSP15), transcript variant 2	NM_177991
107+	Homo sapiens formin homology 2 domain containing 1 (FHOD1)	NM_013241
108+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
110+	Homo sapiens sulfotransferase family, cytosolic, 1A, phenol-preferring, member 2 (SULT1A2), transcript variant 1	NM_001054
111+	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 8	NM_003752
112+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
113	Homo sapiens hypothetical protein CGI-57	BC012821
114+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
115+	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 5 epsilon	BC000490

116	Homo sapiens chromosome 10 clone RP11-168L22	AC068707
117+	Homo sapiens paired box transcription factor (PAX2) mRNA, partial cds, alternatively spliced	AY153484
118+	Homo sapiens aldolase B	NM_000035
119+	Homo sapiens ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B, isoform 2 (ATP6V1B2), mRNA	NM_001693
120+	Homo sapiens pM5 protein (PM5)	NM_014287

Zahlreiche dieser im Two-Hybrid-Screen detektierten Proteine könnten im Zusammenhang mit der Ätiopathogenese des Bardet-Biedl-Syndroms stehen. Dies wird zu diskutieren sein (s. Kap VI).

V.1.9.2 Mehrfach detektierte Proteine

Es zeigte sich, dass einige Proteine mehrfach in diesem Screen positive Ergebnisse ergaben. Sie sollen im Folgenden aufgeführt werden:

Nummern der Klone	Beutegen	Zahl der Klone
3, 4, 7, 15, 25, 30, 34, 37, 39, 51, 52, 54, 57, 63, 67, 68, 71, 72, 73, 75, 77, 80, 85, 93, 98, 112, 118	Homo sapiens aldolase B	28
19, 45, 46, 49, 64, 70	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3	6
12, 24, 26	Homo sapiens PCM 1	3
33, 76, 79	Homo sapiens flotillin 1 (FLOT1)	3
44, 91	Homo sapiens NADH dehydrogenase	2
17, 35	Homo sapiens endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1)	2
74, 84	Homo sapiens aldolase A, fructose-bisphosphate	2

V.1.9.3 OMIM-Recherche zu den positiven Klonen

Über einige der gefundenen Gene liegen bereits Erkenntnisse über ihre Beteiligungen an der Entstehung von Krankheiten und Syndromen vor. Besonders interessant für diese Arbeit waren Gene, deren Mutation zu ähnlichen Phänotypen wie eine Mutation in den *BBS*-Genen führt. Um diese ausfindig zu machen, wurde eine OMIM-Recherche durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt. Über Proteine, die nicht mehr aufgeführt werden, liegen keine OMIM-Einträge vor.

Klon Nr.	OMIM-Identifikationsnr.	Kurzinformation
1	*601609	L-3-HydroxyacylCoA Dehydrogenase short chain, Defizienz
3	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
4	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
5	*172460	Methyltetrahydrofolat Cyclohydrolase Defizienz, Neuralrohrdefekte
7	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
12	*600299	papilläres Thyroidea-Ca
13	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
15	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
17	*603349	Retinopathie, Fettleber, Azoospermie, Herzhypertrophie, Myopathie, hypozelluläres Knochenmark
18	*607069	Bronchial-Ca
21	*104620	Greig-Syndrom, kleinzelliges Lungen-Ca.
24	*600299	papilläres Thyroidea-Ca
25	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
26	*600299	papilläres Thyroidea-Ca
27	+115500	Acatasie, WAGR-Syndrom, Diabetes mellitus
29	*603914	Translationsbeginn
30	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz

33	*606998	Filopodien-Entwicklung
37	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
38	*600831	verschiedene Karzinome
39	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
40	*601143	neuromuskuläre Erkrankungen, Mikrotubuli- assoziiert
44	*603835	mitochondriale Enzephalomyopathie
45	*603914	Translationsbeginn
46	*603914	Translationsbeginn
47	*608231	Synpolydaktylie ?
48	*173325	Onkogenese, Myokardiopathie ("Naxos disease")
49	*603914	Translationsbeginn
50	*601982	klarzelliges Nierenkarzinom
51	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
52	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
54	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
57	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
58	*114130	Migräne, Nozizeption, Essverhalten
59	*102630	Muskelexpression, Bewegung
61	*606753	Mamma-Ca
63	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
65	*602509	Sjörgen-Syndrom
66	*606794	Mitochondrien-Membran-Transport
67	*606794	Mitochondrien-Membran-Transport
68	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
69	*606939	renal tubuläre Azidose, Taubheit
70	*603914	Translationsbeginn
71	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
72	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
73	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz

74	+103850	hämolytische Anämie, Myopathie, mentale Retardierung
75	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
76	*606998	Filopodien-Entwicklung
77	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
79	*606998	Filopodien-Entwicklung
80	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
85	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
87	*184755	lipoider Neurodegeneration, Transport von Sterolen
88	*184755	lipoider Neurodegeneration, Transport von Sterolen
89	*172430	hämolytische Anämie, Hashimoto-Enzephalopathie
91	*603835	mitochondriale Enzephalomyopathie
93	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
98	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
99	*608231	
102	*603294	Expression in lymphatischen Keimzentren
107	*606881	Gliedmassenentwicklung, renale Dystrophie
108	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
110	*601292	Phenolbiotransformation
111	*603916	Translationsbeginn
112	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
114	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
115	*603914	Translationsbeginn
117	*167409	Kolobom des N. opticus, renale Hypoplasie
118	*229600	hereditäre Fructoseintoleranz
119	*606939	monozytäre Leukämie
120	*177850	Pseudoxanthoma elasticum

V.1.10 Direkte Tests auf Interaktionen

Ein weiteres Ziel war es, abzuklären, ob eine Interaktion zwischen den einzelnen BBS-Proteinen besteht. In diesem Fall könnten die Proteine in einem gemeinsamen Subkomplex in der Zelle vorliegen. Zur Klärung dieser Frage wurden direkte Tests mit den BBS-Proteinen BBS1, BBS2, BBS4, BBS6 und BBS7 vorgenommen. Die für diese Proteine codierenden Gene waren innerhalb der Arbeitsgruppe ebenfalls in die Two-Hybrid-Vektoren kloniert worden. So konnten durch ein Mating der die genannten *BBS*-Gene enthaltenden Stämme die Interaktionen der BBS-Proteine direkt getestet werden. Nach der Kreuzung der Stämme und der Selektion der diploiden Zellen auf selektiven – Leu/-Trp-Medium wurde ein lacZ-Test und ein Test auf Wachstum auf QDO-Platten durchgeführt. Die Kreuzung mit den das Plasmid pGADT7-*T* enthaltenden Stämmen diente wiederum zur Überprüfung unspezifischer Interaktionen der einzelnen *BBS*-Gene.

Es wurden die folgenden Kreuzungen vorgenommen:

AH109 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS4</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS6</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS7</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>T</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS4</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS6</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS7</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>T</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS4</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS6</i>

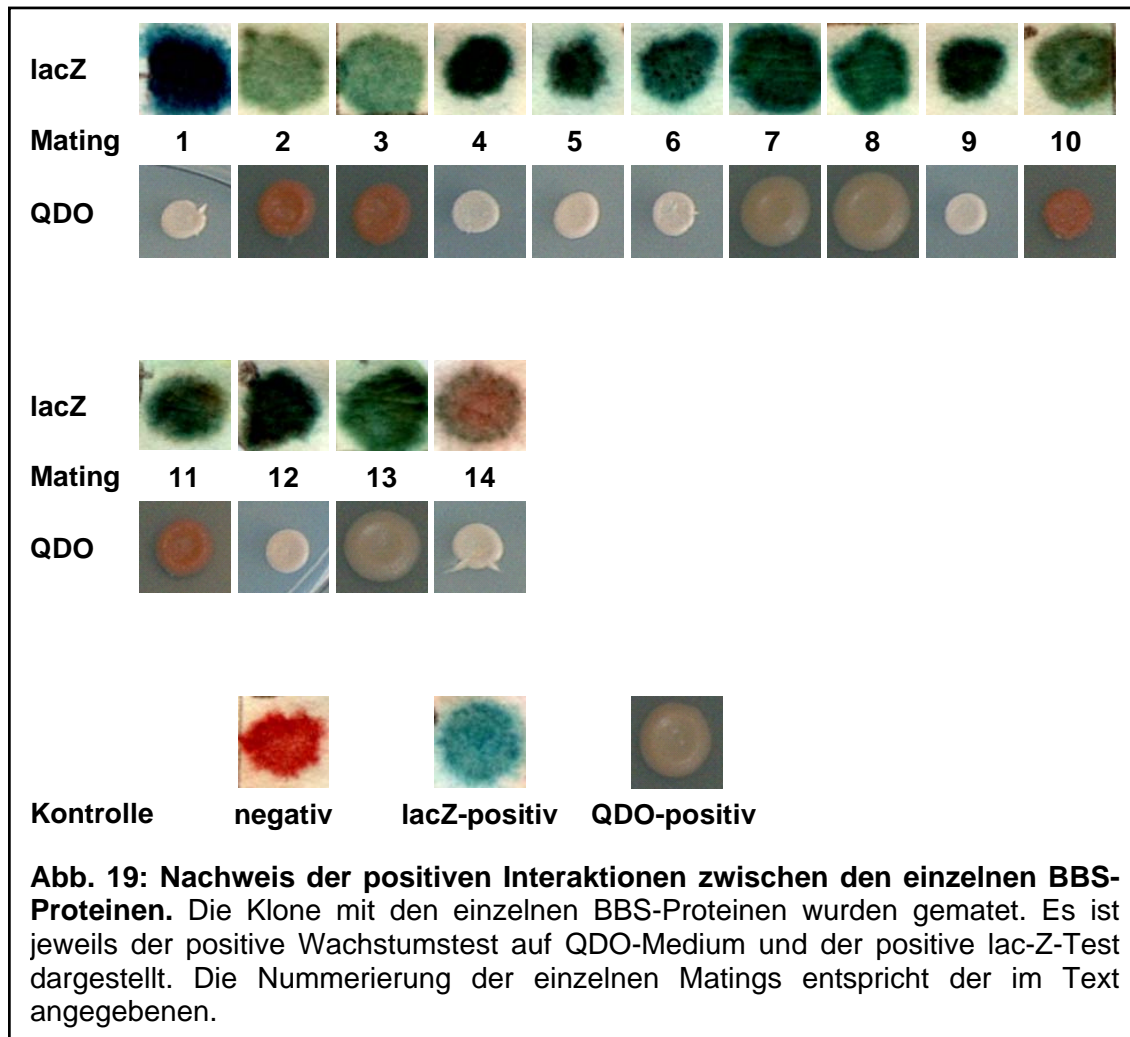
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS7</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>T</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS4</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS6</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS7</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>T</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS4</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS6</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS7</i>
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>T</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS4</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS6</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS1</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS7</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS4</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS6</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS7</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS4</i>

Y187 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS6</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS7</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS4</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS6</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS7</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS1</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS2</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS4</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS6</i>
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS7</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS7</i>

Die diploiden Stämme, in denen folgende Gene exprimiert wurden, zeigten ein Wachstum auf QDO-Platten und auch nach geraumer Zeit eine Blaufärbung im lacZ-Test:

AH109 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS2</i>	(1)
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS4</i>	(2)
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS6</i>	(3)
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS4</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS7</i>	(4)
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS1</i>	(5)
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS2</i>	(6)
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS4</i>	(7)
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS6</i>	(8)
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>BBS7</i>	(9)
AH109 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	Y187 mit pGADT7- <i>T</i>	(10)
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS2</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS6</i>	(11)
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS2</i>	(12)
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS6</i>	(13)
Y187 mit pGBKT7- <i>BBS6</i>	x	AH109 mit pGADT7- <i>BBS7</i>	(14)

Es zeigte sich also für alle Gene ein positives Ergebnis, wenn sie zusammen mit dem *BBS6*-Gen exprimiert wurden. Da dies gilt auch für das T-Antigen gilt, sind die Interaktionen von *BBS6* wahrscheinlich unspezifisch. Außerdem ergab sich eine Interaktion zwischen dem *BBS4* und dem *BBS2*-Protein, zwischen *BBS2*-Proteinen und zwischen dem *BBS4*- und dem *BBS7*-Protein.



V.1.11 Quantifizierung der Interaktionen

Einige der gefundenen positiven Interaktionen wurden mit Hilfe eines Flüssig-lacZ-Assays von Claudia Moch quantifiziert. Es ergab sich, dass zwischen den BBS-Proteinen *BBS4* und *BBS7* die stärkste Interaktion vorliegt. An zweiter Stelle liegt die zwischen den *BBS2*-Proteinen. Die anderen Interaktionen erwiesen sich als sehr schwach.

VI Diskussion

VI.1 Diskussion zum Two-Hybrid-Screen mit BBS4

Ziel dieser Arbeit war es, Proteininteraktionen des humanen Proteins BBS4, das an der Ätiopathogenese des Bardet-Biedl-Syndroms beteiligt ist, ausfindig zu machen und zu beurteilen. Dies geschah mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems auf der Basis der Aktivierung von Reportergenen durch Proteininteraktionen. Zum einen erfolgten diese Untersuchungen für BBS4 mit einer humanen mRNA-Genbibliothek aus der Niere, und zum anderen wurden sie mit den verschiedenen BBS-Proteinen untereinander zur Detektion direkter Interaktionen durchgeführt. Die im vorangehenden Kapitel ausführlich dargestellten Ergebnisse sollen im Folgenden diskutiert werden.

VI.1.1 Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit BBS4 und der humanen mRNA-Genbibliothek (Die Namen der Proteine sind aus der OMIM-Datenbank übernommen)

Die Parameter, die den Erfolg eines Two-Hybrid-Screens charakterisieren, sind als gut zu bezeichnen. Die Mating-Effizienz lag deutlich über 2 %, die Zahl der unabhängigen Klone der eingesetzten Genbibliothek wurde mehrfach gescreent. Die Spezifität der Interaktionen ist hoch, so dass nur wenige Klone ausselektiert als falsch positiv bewertet werden mussten. Die identifizierten Interaktionspartner besitzen daher durchaus Chancen, sich in Folgeversuchen und *in vivo* Experimenten verifizieren zu lassen. Insbesondere gilt dies für die Interaktionspartner, die mehrfach gefunden worden sind. Im Folgenden sollen die im Screen gefundenen Beuteproteine diskutiert werden, die besonders interessant erscheinen. Die Reihenfolge der diskutierten Interaktionspartner orientiert sich an der Häufigkeit, mit der sie detektiert wurden. Im Anschluss daran erfolgt zur besseren Übersichtlichkeit eine tabellarische Darstellung der Prozesse und Strukturen, an denen die einzelnen Proteine beteiligt sind und die in Zusammenhang mit dem Bardet-Biedl-Syndrom stehen könnten.

VI.1.1.1 Homo sapiens Aldolase B

Dieses Protein ist 28-mal und damit bei weitem am häufigsten im Two-Hybrid-Screen mit BBS4 gefunden worden. Aus diesem Grunde soll es auch an erster Stelle diskutiert werden. Das Protein ist am Fructosestoffwechsel beteiligt und spaltet Fructose-1-Biphosphat und auch Fructose-1-Phosphat. Eine Mutation im *Aldolase-B*-Gen führt zur Fructoseintoleranz. Diese äußert sich meist nach der ersten Obstnahrung eines Kindes in Erbrechen und Übelkeit. Bei betroffenen Patienten sollte fructosehaltige Nahrung vermieden werden. Es sind Fälle beschrieben worden, bei denen im Verlauf der Krankheit eine renale tubuläre Azidose entsteht (Mass *et al.*, 1966). Des Weiteren gab es Fälle, bei denen eine Wachstumsverzögerung diagnostiziert wurde (Mock *et al.*, 1983, Ali *et al.*, 1998). Diese beiden möglichen Folgen der dauernden Ingestion von Fructose bei betroffenen Patienten erinnern an das klinische Bild des BBS-Patienten, bei denen möglicherweise auch eine Störung im Zuckerstoffwechsel vorliegt, wie das klinische Erscheinungsbild und die Verwandtschaft des Proteins BBS4 zur N-Acetyl-Glucosamin-Transferase nahe legen.

VI.1.1.2 Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF3)

Diese Beuteprotein (verschiedene Untereinheiten) wurde am zweithäufigsten in dem Screen mit BBS4 gefunden, nämlich sechs Mal. Es handelt sich um den größten der eIFs mit 10 Untereinheiten. Dieser eIF ist sehr stark konserviert, was auf seine essentielle Bedeutung hinweist (Asano *et al.*, 1997). Die Tatsache, dass der eIF 3 so häufig gefunden wurde, lässt vermuten, dass eine Interaktion mit BBS4 wirklich besteht, deren Funktion aber unklar bleibt.

VI.1.1.3 Pericentriolar material 1 (PCM1)

Interessant ist auch die Interaktion von BBS4 mit dem Protein PCM1, die in diesem Two-Hybrid-Assay drei Mal gefunden wurde. Dies bestätigt die richtungsweisenden Ergebnisse von Katsanis *et al.*, 2004, die in der Einleitung bereits dargestellt wurden. PCM1 ist essentiell beteiligt am Aufbau des Zentriols und zwar genauer gesagt an der Verankerung mikrotubulärer Proteine am Zellpol (Dammermann und Merdes, 2002). BBS4 fungiert als Adapter zum Dynein-Transport an den Mikrotubuli. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das *PCM1*-Gen in kolorektalen und hepatozellulären

sowie in Bronchial-Karzinomen mutiert ist (Ohata *et al.*, 1994). Diese Erkrankungen treten allerdings bei BBS-Patienten nicht gehäuft auf. Was allerdings diesen Klon weiterhin besonders interessant macht, ist das Ergebnis aus dieser Arbeit, dass BBS4 auch mit Dynactin 1 interagiert (Klon 40) und dieses Protein ist wiederum bereits als Interaktionspartner von PCM1 beschrieben worden (Dammermann und Merdes, 2002). Bei fehlender Expression des Drosophila-Homologs des *Dynactin 1*-Gens kommt es zu einer massiven Störung des Aufbaus von neuromuskulären Synapsen (Eaton *et al.*, 2002). Neuronale Störungen wiederum sind Kardinalsymptome von BBS, wenn auch einschränkend zu sagen ist, dass hier wahrscheinlich eher interneuronale Verbindungen betroffen sind. Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis auf eine Funktion des BBS4-Proteins im zentriolären Kompartiment der eukaryoten Zelle.

VI.1.1.4 Homo sapiens flotillin 1 (FLOT1)

Das mit BBS4 interagierende Protein ist in diesem Screen drei Mal detektiert worden. Seine Funktion ist sehr interessant für die Suche nach relevanten Interaktionspartnern. Es ist nämlich in die Filopodiengenese von neuronalen Zellen involviert (Hazarika *et al.*, 1999). In Analogie zu den Betrachtungen zu PCM1 bestätigt sich, dass BBS4 an der Ausbildung von filamentären Strukturen in Neuronen beteiligt sein könnte.

VI.1.1.5 Homo sapiens endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1)

EPAS1 wurde zweimalig in diesem Screen als BBS4- Interaktionspartner gefunden. Es gehört zur Superfamilie der PAS-Proteine und wird vor allem in stark vaskularisierten Geweben exprimiert. Durch hypoxämischen Zellstress wird es als Transkriptionsfaktor verschiedener Gene aktiviert (Tian *et al.*, 1997 und 1998). Die Knockout-Maus für EPAS1 zeigte Multiorgan-Pathologika. So litten die Mäuse an hepatischer Steatose, an kardialer Myopathie, an skelettaler Muskelschwäche, an einer Retinadegeneration und Azoospermie (Scortegagna *et al.*, 2003). Die letzten beiden Symptome gehören auch zu den Primärsymptomen des Bardet-Biedl-Syndroms. Auf der anderen Seite muss allerdings kritisch berücksichtigt werden, dass EPAS1 als Transkriptionsfaktor fungieren kann und damit eine biochemische Bestätigung der Interaktion besonders wichtig wäre.

VI.1.1.6 Homo sapiens aldolase A, fructose-bisphosphate

Dieses Protein wurde ebenfalls zweimal als Interaktionspartner von BBS4 detektiert. Es ist Bestandteil der enzymatischen Folge in der Glykolyse, das Enzym spaltet Fructose-1-Bisphosphat, nicht aber wie die Aldolase B auch Fructose-1-Phosphat. Es wurden klinische Fälle beschrieben, bei denen der bei einer Mutation entstehende Phänotyp durchaus Ähnlichkeiten zu dem der BBS-Patienten aufwies: Kleinwüchsigkeit, mentale Retardation, Pubertas tarda und hämolytische Anämie (Beutler *et al.*, 1973). Die ersten beiden Symptome treten auch regelmäßig beim BBS auf.

VI.1.1.7 Homo sapiens NADH-Dehydrogenase

Das letzte mehrfach gefundene Beuteprotein ist die NADH-Dehydrogenase, sie wurde zwei Mal gefunden. Sie ist am mitochondrialen Protonentransport der Zelle in den intermembranösen Raum im Komplex I der Atmungskette beteiligt (Loeffen *et al.*, 1998). Krankheiten, die im Zusammenhang mit speziell diesem Enzym stehen, sind nicht beschrieben. allerdings kann eine Mutation im Komplex I zum Leigh-Syndrom, zur neuronalen Optikusatrophie und zur Enzephalomyopathie (Bennit *et al.*, 2004) führen. Dies sind klinische Erscheinungsbilder, die durchaus an BBS erinnern. Die NADH-Dehydrogenase wurde allerdings als falsch positives Ergebnis in anderen Two-Hybrid-Screens genannt. (Munder *et al.*, 1997) Insofern muss dieser Fund genau analysiert werden.

Im Folgenden werden die Beuteproteine diskutiert, die nur einmal in diesem Screen mit BBS4 als Angelprotein gefunden wurden, die aber als besonders interessant zu bezeichnen sind. Die Tatsache, dass sie jeweils nur einmal gefunden wurden, kann darauf beruhen, dass es sich um eine eher schwache Interaktion handelt oder darauf, dass sie nur wenig exprimiert werden und daher in der Genbibliothek seltener vorhanden waren. Für alle nur einmal gefunden Proteine gilt, dass eine biochemische Bestätigung der Interaktion besonders vonnöten ist.

VI.1.1.8 Homo sapiens Short chain L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase

Dieses Protein ist involviert in den Fett-Metabolismus der Zelle. Genauer gesagt spielt es eine essentielle Rolle bei der β -Oxidation. Bei einer Defizienz kommt es zu

Hypoglykämien und Ketosen (Bennet *et al.*, 1996), es ist aber auch eine Enzephalopathie beschrieben worden (Tein *et al.*, 1991). Metabolische Prozesse spielen wahrscheinlich auch eine Rolle beim BBS.

VI.1.1.9 Homo sapiens, Similar to catalase

Wie der Name dieses Proteins anzeigt, besteht eine starke Ähnlichkeit zur menschlichen Katalase. Patienten bei denen eine Katalase-Defizienz besteht, können ein dem BBS ähnliches klinisches Bild zeigen. Die Kinder leiden am sogenannten WAGR-Syndrom, das sich zusammensetzt aus einer Aniridie und einem Wilms-Tumor, außerdem entwickeln die Patienten z.T. Diabetes mellitus und Hypertonus. Im Laufe der Erkrankung kann es wie bei den Patienten mit BBS zu einer progredienten Niereninsuffizienz kommen, die zum Tode führen kann (Breslow *et al.*, 2003). Diese Übereinstimmungen machen das Enzym für weitere Untersuchungen interessant. Der beim WAGR-Syndrom vorliegende genetische Defekt ist allerdings nicht abschließend geklärt, zurzeit wird eine Deletion auf 11p13 als ursächlich vermutet (Fischbach *et al.*, 2005). Die Katalase ist ebenfalls in dieser Chromosomenregion codiert, beim WAGR-Syndrom aber nicht notwendigerweise deletiert.

VI.1.1.10 Homo sapiens 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1)

Das mit BBS4-interagierende Protein ist in diesem Screen nur einmal entdeckt worden. Es ist besonders interessant wegen seiner Rolle in der Entstehung des klarzelligen Nierenkarzinoms (Audebert *et al.*, 2000). OGG1 ist an der DNA-Reparatur beteiligt, durch einen Aminosäureaustausch *ARG46GLN*, wird die Aktivität des Enzyms stark eingeschränkt und die Tumorgenese gefördert (Audebert *et al.*, 2000). Wie in der Einleitung erläutert, ist die Entstehung des klarzelligen Nierenkarzinoms ein Heterozygoten-Effekt bei einer Mutation in den BBS-Genen. Dieser Effekt könnte also auf einer Interaktion zwischen BBS4 und OGG1 beruhen.

VI.1.1.11 Homo sapiens calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha (CALCA)

Ebenfalls nur einmal gefunden wurde das Protein CALCA. Dieses Protein entsteht durch Translation von protranskriptionell modifizierter mRNA des *Calcitonin*-Gens. CALCA kommt vor allem in neuronalen Geweben vor (Rosenfeld *et al.*, 1982). Dort ist

es besonders reichlich im Hypothalamus zu finden. Die Stärke der Expression von CALCA variiert während der Entwicklung (Amara *et al.*, 1982). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CALCA einen Einfluss auf die Durchblutung und den Catecholaminstoffwechsel im Gehirn hat, in diesem Zusammenhang ist auch die erhöhte Expression im Locus coeruleus zu sehen. (Tiller-Borcich *et al.*, 1988). Außerdem soll das Protein an der Regulation des Nahrungsverhaltens beteiligt sein (Rosenfeld *et al.*, 1983). Diese Funktion würde es für eine Funktion an der Genese der Adipositas beim Bardet-Biedl-Syndrom interessant machen.

VI.1.1.12 Homo sapiens actin beta (ACTB)

Aktin gehört zu den Mikrofilamenten der menschlichen Zelle, es gibt muskuläre und zytoskelettale Formen. Bei ACTB handelt es sich um ein Element des Zytoskeletts. Das codierende Gen ist auf Chromosom 7 lokalisiert (Kedes *et al.*, 1985; Habets *et al.*, 1992). Damit wurde also ein weiteres Protein gefunden, dass eine Verbindung von BBS zu zytoskelettalen Filamenten nahe legt. Actin beta ist entscheidend beteiligt am axonalen Transport in Neuronen. Dort steht es im Zusammenhang mit dem im folgenden besprochenen Beuteprotein Dynactin.

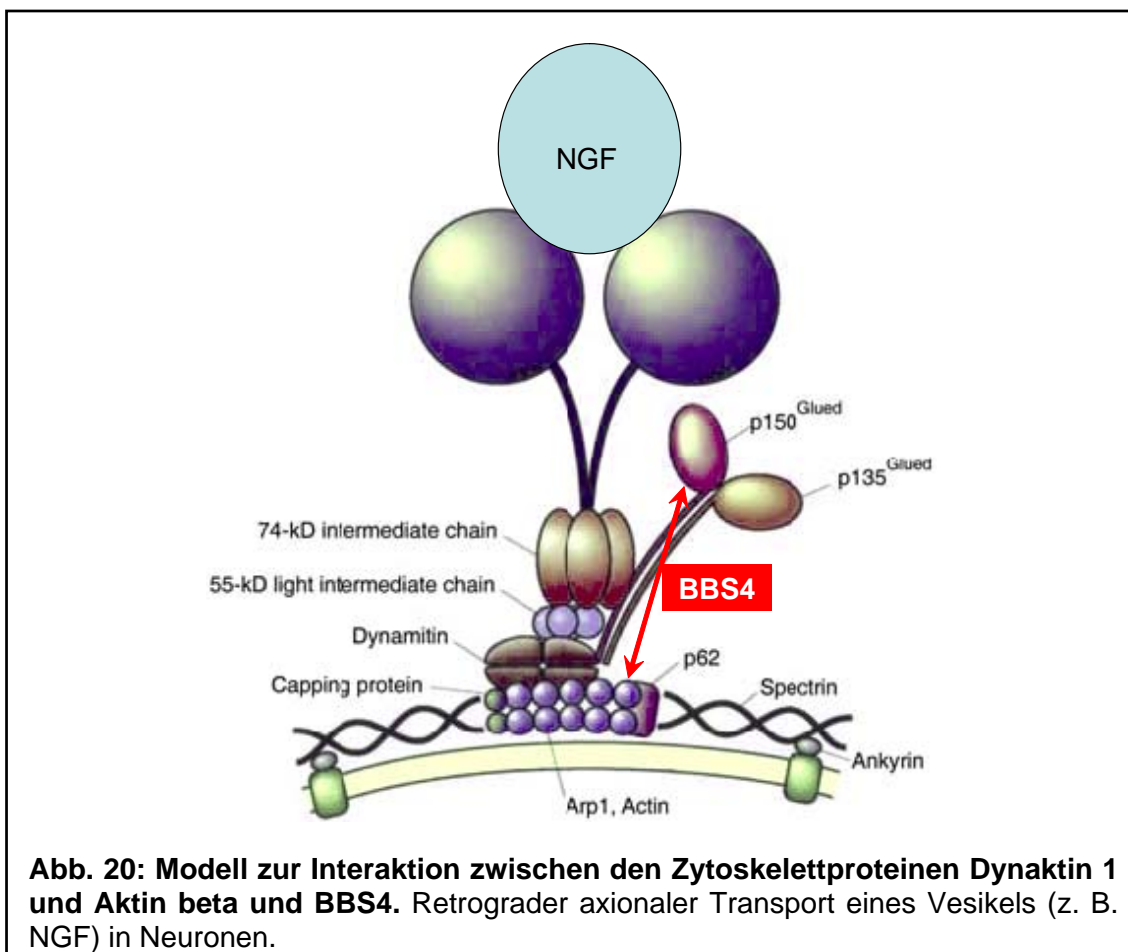
VI.1.1.13 Homo sapiens dynactin 1

Dynactin 1 ist ein Protein des Dynactin-Komplexes; dieser ist notwendig, um eine Verbindung zwischen dem Dynein-Komplex und Transportvesikeln herzustellen. Die Transportvesikel des cytoplasmatischen Dyneinkomplexes werden vor allem im retrograden axonalen Transport zum sogenannten Minus-Ende filamentärer Strukturen im Axon benötigt. Die filamentären Strukturen des axonalen Transportsystems bestehen im wesentlichen aus Actin, welches ebenfalls als Beuteprotein gefunden wurde. Des Weiteren wurde nachgewiesen, daß Dynactin am Transport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat und bei der Spindelorganisation (Paschal *et al.*, 1987; Hirokawa *et al.*,) teilnimmt. Es spielt dabei eine wesentliche Rolle bei der Ausrichtung des Golgiapparates und des Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC) während der Zellmigration (Palazzo *et al.*, 2001). Somit stellt Dynactin ein Verbindungsglied zwischen Mikrofilamenten und Mikrotubuli des Zytoskeletts dar, es wird als Hetero-Motor-Komplex bezeichnet (Goode *et al.*, 2000). Zu dieser Gruppe

gehören auch die Formin-Homologie Proteine, von denen ebenfalls eines im Screen gefunden wurde

Für den Dynactin-Komplex wurde eine Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen nachgewiesen, z. B. Beim Morbus Alzheimer und bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) (Holzbaur *et al.*, 2002 und 2006). Für die ALS gibt es sogar ein Mausmodell, welches darauf beruht, dass der Dynein/Dynactin-Komplex in den Neuronen der Tiere zerstört wurde (Holzbaur *et al.*, 2002). Auch bei der Entstehung des Down-Syndroms und der zugrundeliegenden meiotischen Fehlfunktion scheint Dynactin beteiligt zu sein (Gulesserian *et al.*, 2002).

Dynactin scheint also insgesamt den Zusammenhang zwischen BBS4, PCM1 (s.o.), Actin beta herzustellen. Es ist wahrscheinlich für die Mitorganisation des Mikrotubuliapparates und außerdem für den intrazellulären Transport an Mikrofilamenten zuständig (Abb. 20).



VI.1.1.14 Homo sapiens tetratricopeptide repeat protein 4 (TTC4)

Auch dieses Protein wurde nur einmal im Screen mit BBS4 gefunden. Eine Mutation im codierenden Gen wurde beim Mamma-Ca gefunden (Su *et al.*, 1999). Besonders interessant ist dieses Protein aber nicht aufgrund dieser mit ihm assoziierten Klinik, sondern aufgrund seiner Domänenstruktur. Es enthält nämlich das TPR-Motiv. Dieses Motiv ist auch Bestandteil des BBS4-Proteins, wie in der Einleitung erläutert wurde. Es wird vermutet, dass es Proteininteraktion dient. Diese Vermutung wird durch den Fund im Two-Hybrid-Screen verstärkt. Für dieses Protein wäre es also besonders aufschlussreich, die Bindung der einzelnen Proteindomänen zu untersuchen.

VI.1.1.15 Homo sapiens ATPase, H⁺ transporting

Die H⁺-ATPase des Menschen besteht aus mehreren Untereinheiten. In diesem Screen wurde die B-Untereinheit als Interaktionspartner von BBS4 gefunden. Es sind Mutationen im Gen für diese Untereinheit gefunden worden, die zu Taubheit und renaltubulärer-Azidose führen (Karet *et al.*, 1999). Eine solche Kombination aus sensorischen und renalen Schäden findet sich auch beim BBS.

VI.1.1.16 Homo sapiens sterol carrier protein 2 (SCP2)

Dieses Protein dient dem intrazellulären Transport von Cholesterol zu den Mitochondrien, wo es weiter verwertet wird. Möglicherweise ist es auch am Transport anderer Lipide beteiligt (Yamamoto *et al.*, 1991). Leider ist über die genaue Funktion des Proteins noch wenig bekannt. Allerdings ist zu vermuten, dass an der Entstehung der Adipositas beim Bardet-Biedl-Syndrom auch Faktoren des Lipidstoffwechsels beteiligt sind.

VI.1.1.17 Homo sapiens enolase 1 (alpha) (ENO1)

Dieses Protein besteht aus zwei alpha-Untereinheiten. Die Enolase wird von dem gleichen Gen codiert wie das Protein Tau-Crystallin, einem strukturellen, konservierten Retina-Protein (Wistow *et al.*, 1984, OMIM). Tau-Crystallin besitzt ebenfalls Enolase-Aktivität, diese ist aber im Vergleich zur Enolase deutlich reduziert. Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf posttranslationalen Modifikationen. Die Retinadegeneration mit nachfolgender Erblindung gehört zum BBS. Somit könnte hier ein Zusammenhang

zwischen der Interaktion des Strukturproteins Tau-Crystallin mit BBS4 und der Degenration der Retina bestehen.

VI.1.1.18 Homo sapiens formin homology 2 domain containing 1 (FHOD1)

Formin-homologe Proteine (1 und 2) sind beteiligt an der Zellorganisation und an der Gliedmaßenentwicklung. Sie wurden benannt nach Formin-Proteinen, die an der Ausbildung der Gliedmaßen und der Nierenentwicklung beteiligt sind (Woychik et al., 1990). Es sind verschiedene Mutationen beschrieben, die jeweils zu Deformitäten der Gliedmaßen führen (Cui *et al.*, 2005) Diese Funktionen legen eine Beziehung zum BBS nahe Außerdem gehören sie zu den sogenannten heterologen Motor-Proteinen (vgl. Dynactin) und sind damit wiederum am Aufbau und der Funktion des Zytoskeletts beteiligt.

VI.1.1.19 Homo sapiens paired box transcription factor (PAX2)

Das Gen für dieses BBS4-interagierende Gen ist auf Chromosom 10 codiert. Es sind mehrere Fälle beschrieben worden, in dem eine Translokationsmutation im *PAX2*-Gen zum Nervus-opticus-Kolobom-Nieren-syndrom führt (Narahara et al., 1997). Die Expression des *PAX2*-Gens findet in der Entwicklung der Augen, der Nieren, des Ohrs und des ZNS statt (Sanyanusin et al., 1995). Von einer Mutation im *PAX2*-Gen betroffene Patienten leiden unter einer progredienten Einschränkung der Nierenfunktion und Erblindung, beides Eigenschaften, die auch BBS-Patienten kennzeichnen.

VI.1.1.20 Homo sapiens pM5 protein (PM5)

Das Gen, das PM5 codiert, gilt als Kandidatengen für die rezessive Form des Pseudoxanthoma elasticum. Dieses Syndrom ist durch zahlreiche klinische Symptome charakterisiert, es ist eine Krankheit der elastischen Fasern. Die Haut ist überdehnbar, die Patienten leiden aber auch an einer Retinadegeneration und an kardiovaskulären Problemen (Struk et al., 1997; Goodman et al., 1963). Die okuläre Symptomatik könnte einen Hinweis auf die Verbindung zum Bardet-Biedl-Syndrom liefern.

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass zahlreiche sehr interessante Proteine als Interaktoren von BBS4 identifiziert wurden. Zur besseren Übersichtlichkeit und Strukturierung können sie in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Es wurden zum einen solche Proteine gefunden, an der Entstehung der Kardinalsymptome des Bardet-Biedl-Syndroms in den verschiedenen Organsystemen beteiligt sein könnten. Zum anderen sind Proteine detektiert worden, die neue Aufschlüsse über die mögliche zelluläre Funktion von BBS4 liefern können. Zur Übersicht ist dies in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Synopsis der Beuteproteine und ihrer Funktion

Klon	Beteiligung des Beuteproteins an			
	Nieren- Entwicklung	Retinastabilität/- entwicklung	Gliedmassen- Entwicklung	neuronale Entwicklung
aldolase B	+			
eIF3				
PCM1				+
FLOT1				
EPAS1		+		
aldolase A				+
NADH- Dh.		+		+
s.t. catalase	+	+		
OGG1	+			
CALCA				+
ACTB				
Dynactin1				+
TTC4				
ATPase	+			+
SCP2				
ENO1		+		
FHOD1	+		+	
PAX2	+	+		
PM5		+		

	Wachstum	Metabolismus	genitale Entwicklung	Zelluläre Funktion
aldolase B	+	+		
eIF3				
PCM1				+
FLOT1				+
EPAS1			+	
aldolase A	+	+		
NADH-Dh.				
s.t. catalase				
OGG1				
CALCA				
ACTB				+
Dynactin1				+
TTC4				+
ATPase				
SCP2		+		
ENO1				
FHOD1				+
PAX2				
PM5				

Die Proteine, die in dieser Tabelle in mehreren Spalten gekennzeichnet sind, könnten an der Entstehung mehrerer Symptome des Bardet-Biedl-Syndroms beteiligt sein. Ihre weitere Untersuchung sollte besonders aufschlussreich sein.

Interessante Ergebnisse lässt vor allem die weitere Untersuchung der am Zytoskelett und der Zellmotilität beteiligten Beuteproteine erwarten. Aus jüngsten Forschungsergebnissen ist immer deutlicher geworden, dass eine Störung im Zytoskelettsystem der Zelle die Grundlage des Bardet-Biedl-Syndroms darstellt. Die gefundenen Proteine Dynactin und PCM1 sind an der fehlerhaften Organisation des Zytoskeletts beteiligt (bereits nachgewiesen von Kim *et al.*, 2004), FHOD und

Dynactin könnten zur fehlerhaften Gliedmaßenentwicklung führen. Es wurde jüngst eine Verbindung zwischen dem Zilienprotein Smoothend (Smo) und dem Hedgehog (Hh)-Signalweg, welcher essentiell für die Gliedmaßenentwicklung ist, aufgezeigt (Corbit *et al.*, 2005). Die Lokalisation des Smo-Proteins an das Zilium erfolgt in Abhängigkeit von Hh. Somit könnte erstmals postuliert werden, daß die Polydaktylie der BBS-Patienten in direktem Zusammenhang mit einer Störung des Zytoskeletts steht. Dynactin und Actin könnten außerdem zur Störung des neuronalen Transports und nachfolgend zur Degeneration von Nervenzellen führen. BBS4 als Interaktionspartner aller dieser Proteine stellt das Bindeglied zwischen ihnen und damit zu den komplexen Symptomen des Bardet-Biedl-Syndroms auf der Grundlage einer Fehlfunktion im Zytoskelett dar.

VI.1.2 Weiterführende Versuche

VI.1.2.1 Quantifizierung der Interaktionen

Die Interaktion zwischen BBS4 und den gefunden Beuteproteinen sollten mit Hilfe eines Flüssig-lacZ-Tests quantifiziert werden, um eine Rangfolge der Stärke der Interaktionen ermitteln zu können. Mittlerweile gibt es erweiterte Yeast-Two-Hybrid-Systeme, bei denen mit Hilfe einer Kopplung an GFP (grün-fluoreszierendes-Protein) oder an Immunfluoreszenzsysteme eine schnelle und genaue Quantifizierung der Interaktionen vorgenommen werden kann. Aufgrund der Ergebnisse könnte man für die weiteren Versuche besonders geeignete Beuteproteine auswählen, die sich durch eine starke Interaktion auszeichnen.

VI.1.2.2 Weitere Verifizierungsmöglichkeiten

Zur endgültigen Verifizierung der Interaktion sollten die Gene der Beuteproteine in voller Länge auch in das Angelploid kloniert werden. Ein Test auf eine Interaktion mit BBS4 im Beuteploid durch Kotransformation oder Mating sollte dann ebenfalls positiv ausfallen. Durch Einführung einer Frameshift-Mutation, was mit den Two-Hybrid-Vektoren relativ einfach möglich ist, sollten Proteinprodukte entstehen, die nicht mit BBS4 interagieren. So können falsch-positive Klone noch sicherer ausselektiert werden.

VI.1.2.3 Bestätigung der Interaktionen mit der Coimmunopräzipitation

Es wäre notwendig, die im Screen gefundenen Interaktionen mit Hilfe biochemischer Methoden zu verifizieren. Zu diesem Zweck sollte eine Koimmunopräzipitation der Interaktionspartner stattfinden. Dies bietet den Vorteil, dass das System unabhängig ist von der Transkriptionsaktivierung der Reportergene und deren Fehlerquellen. Es bietet sich an, auf die auf den Two-Hybrid-Vektoren codierten HA- und Myc- Epitope zurück zu greifen.

VI.1.2.4 Identifizierung der interagierenden Domänen

Es sind noch zahlreiche Versuche denkbar, die schließlich zur genauen Charakterisierung der Interaktionen von BBS4 führen können. So wäre es interessant zu erfahren, welche Domänen für die einzelnen Interaktionen zuständig sind, dazu müssen die Domänen einzeln in die Two-Hybrid-Vektoren kloniert werden. Dann könnten die exprimierten Proteindomänen einzeln mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Reportersystems auf eine Interaktion mit BBS4 überprüft werden.

VI.1.2.5 Regulation der Interaktion

Es ist auch zu vermuten, dass einige der Interaktionen einer Regulation unterliegen, beispielsweise durch Modifikationen der Interaktionspartner wie Phosphorylierung und Methylierung. Auch dies wäre genauer zu bestimmen, z. B. durch Identifizierung von konservierten Motiven in den Beuteproteinen, an denen eine Modifikation häufig stattfindet und deren gezielte Mutation. Dann wäre zu analysieren, ob die mutierten Proteine noch interagieren.

VI.1.2.6 Mutationsanalyse

Für zahlreiche der gefundenen Proteine sind bereits Mutationen bekannt, die zur Entstehung eines charakteristischen, vom Wildtyp abweichenden Phänotyps führen. Es wäre aufschlussreich zu analysieren, ob diese veränderten Proteine ebenfalls mit BBS4 interagieren, oder ob die Interaktion aufgehoben ist. Daraus könnte man wiederum Schlüsse ziehen über die interagierenden Proteindomänen, sowie über direkte und indirekte Effekte der einzelnen Mutationen.

VI.1.3 Ergebnisse der direkten Tests mit den einzelnen BBS-Proteinen

Die Überprüfung der Interaktionen zwischen den verschiedenen BBS-Proteinen ergab für BBS4 mit BBS7 und BBS2 sowie für BBS2 mit BBS2 ein positives Testergebnis. BBS6 interagiert scheinbar mit allen anderen BBS-Proteinen, allerdings war auch die Negativkontrolle mit BBS6 positiv. Dies ist wahrscheinlich darauf zurück zu führen, dass BBS6 Ähnlichkeiten mit einem Chaperon-Protein aufweist und unspezifisch mit allen Proteinen interagiert.

Das Ergebnis der direkten und spezifischen Interaktionen ist besonders interessant, denn falls es durch weiterführende Versuche bestätigt werden kann, ist die Erstellung eines neuen Modells möglich. Damit ließe sich eine Vorstellung gewinnen, wie die BBS-Proteine durch Interaktionen gemeinsam an der Entstehung des BB-Syndroms beteiligt sind. Außerdem wäre es möglich, dass die BBS-Proteine auf zellulärer Ebene an den gleichen Vorgängen teilnehmen oder während eines intrazellulären Transportprozesses interagieren. BBS4 ist häufig an den triallelischen Erbgängen des BBS beteiligt. Möglicherweise besteht dabei ein Zusammenhang mit den Interaktionen auf Proteinebene. Die Folgen einer Mutation im BBS4-Gen hängen eventuell davon ab, ob das codierte Protein noch mit anderen BBS-Proteinen interagieren kann, oder ob die Interaktion aufgehoben ist.

VI.1.3.1 Quantifizierung der Interaktion zwischen BBS4 und BBS7/BBS2

Die Quantifizierung der Interaktionen hat gezeigt, dass es sich um eine eher schwache Interaktion handelt, die zudem abhängig davon zu sein scheint, welcher der Faktoren sich im Angel- und welcher sich im Beuteplasmid befindet. Darauf sollte bei der Planung weiterer Versuche Rücksicht genommen werden. Man kann spekulieren, dass der unterschiedliche Einfluss der Fusionsepitope auf ihrer unterschiedlichen Größe (HA: 8; Myc: 11 Aminosäuren) beruht. Es besteht die Möglichkeit, dass die Faltung der BBS-Proteine durch die Epitope verändert wird, so dass eventuell die interagierenden Domänen der Proteine negativ beeinflusst werden. Die Faltung der Proteine wird wahrscheinlich auch durch die verschiedenen Eigenschaften der Stämme beeinflusst, so dass bei den Kreuzungen nicht unbedingt reziproke Ergebnisse vorliegen müssen.

VI.1.4 Weiterführende Versuche

VI.1.4.1 Biochemische Bestätigung der direkten Tests

Um die aufgeworfenen Hypothesen und Fragen bearbeiten zu können, muss zunächst einmal die Interaktion zwischen den beiden BBS-Proteinen *in vitro* durch eine Immunokopräzipitation der beiden Proteine verifiziert werden. Dies bietet sich an, weil die Proteine jeweils mit verschiedenen Fusionsepitopen verfügbar sind. Aus dem Two-Hybrid-Screen liegen beide mit einem Myc- und einem HA-Fusionsepitop vor. Die zu testenden Interaktionspartner können bei einer tatsächlichen Interaktion aneinander gebunden aufgereinigt werden. Die Detektion der beiden Interaktionspartner erfolgt dann im Westernblot mit spezifischen Antikörpern.

VI.1.4.2 Überprüfung der Kolo-kalisation der BBS-Proteine

Sollte die Immunopräzipitation wie erhofft die Interaktion bestätigen, könnte versucht werden, eine mögliche Kolo-kalisation der BBS-Proteine zu zeigen. Dies könnte beispielsweise mit einer Immunfluoreszenz in der Zellkultur erfolgen, auch für diesen Versuch könnten die vorliegenden Epitope genutzt werden. Des Weiteren wäre es interessant zu überprüfen, ob BBS2 oder BBS7 in der Zentriolenregion lokalisiert sind, wie das für BBS4 postuliert wird (Katsanis *et al.*, 2004).

Alternativ könnte man ein BBS-Protein mit GST markieren und so durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar machen sowie für einen GST-Pulldown-Assay nutzen, mit dem sich dann wiederum eine potentielle Interaktion nachweisen lässt

VI.1.4.3 Nachweis der interagierenden Domänen

Schließlich wäre es interessant zu erfahren, welche Domänen der BBS-Proteine eigentlich miteinander agieren. Dies könnte klarer werden, wenn man einzelne bekannte Domänen der Proteine, wie das TPR-Motiv in BBS4 und die beta-Propeller-Region in BBS4 und BBS7 in die Two-Hybrid-Vektoren klonieren würde und dann wiederum die Interaktionen zwischen den verschiedenen Konstrukten testen würde.

VI.1.4.4 Regulation der Interaktion

Proteininteraktionen in eukaryotischen Organismen unterliegen oft einer strikten Regulation. Diese kann beispielsweise in einer Phosphorylierung/Dephosphorylierung der Interaktionspartner bestehen. Zur Klärung solcher Mechanismen könnte nach konservierten Motiven für Modifikationen an Proteinen gesucht werden. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Durchführung einer MALDI-TOF Massenspektroskopie-Analyse, mit deren Hilfe Aussagen über Modifikationen wie z. B. zusätzliche Gruppen an Proteinen gemacht werden können. Anschließend könnten dann Versuche folgen, die zeigen, ob nach Mutation einer Modifikationsstelle noch eine Interaktion zwischen den BBS-Proteinen nachweisbar ist.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit mit BBS4 durchgeführten Versuche liefern Hinweise auf eine zeitlich und örtlich gesteuerte Verwertung von genetischer Information. Aus den mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Screens gefundenen Interaktionen konnten neue Erkenntnisse über die mögliche Funktion des untersuchten Proteins BBS4 abgeleitet werden. Insbesondere wurden weitere Hinweise gefunden, dass BBS4 am Aufbau und der Funktion des Zytoskeletts beteiligt ist. Des Weiteren wurde aufgezeigt, dass BBS4 mit Proteinen des Zucker- und Fettstoffwechsels interagiert. Als dritte Gruppe wurden Proteininteraktoren gefunden, für die Defekte bekannt sind, die zu BBS-ähnlichen Phänotypen führen. Aus dem Ergebnis, dass BBS4 auch mit anderen BBS-Proteinen wechselwirkt, lässt sich möglicherweise ein Kausalzusammenhang zur Bevorzugung des triallelischen Erbganges für *BBS4* ableiten. Auf der Basis der gewonnenen Erkenntnisse werden sich zahlreiche weitere Untersuchungen anschließen müssen, um die Rolle von BBS4 in der Entstehung des Bardet-Biedl-Syndroms vollständig aufklären zu können.

VII Zusammenfassung

Weltweit steigt die Zahl der adipösen und übergewichtigen Menschen stark an, mittlerweile sind epidemische Ausmaße erreicht worden. Die Folgen für die Betroffenen und das Gesundheitssystem (nach WHO-Schätzung 5 % der Gesundheitskosten) sind enorm und eines der Hauptprobleme der gegenwärtigen Medizin. Die Erforschung syndromaler Adipositas bietet einen Zugang zur Aufklärung der dem Übergewicht auf zellulärer Ebene zugrunde liegenden Mechanismen.

Adipositas gehört zu den Leitsymptomen des Bardet-Biedl-Syndroms, das in dieser Arbeit untersucht wurde. Daneben bestehen fünf weitere Kardinalsymptome, die das klinische Bild des BBS-Patienten definieren: Retinopathie, Polydaktylie, Nephropathien, Hypogenitalismus und mentale Retardierung. Es sind neun Gene detektiert worden, deren Mutation einzeln oder kombiniert zur Ausprägung des Bardet-Biedl-Syndroms führen kann. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Proteininteraktionen zwischen einzelnen BBS-Proteinen bestehen. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob sich für das BBS4-Protein weitere Interaktionspartner aus dem gesamten humanen Proteinpools identifizieren lassen.

Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner wurde ein „Two-Hybrid-Screen“ mit BBS4 als Angelprotein durchgeführt. Dabei wurde die Expression von BBS4 als Fusionsprotein mit einer DNA-BD-Domäne mit Hilfe eines Western-Blots nachgewiesen. Als Beuteproteine dienten Fusionsproteine mit einer DNA-AD-Domäne, die aus einer Genbibliothek translatiert wurden. Die Detektion der Interaktionen wird durch die Aktivierung von Reportergenen ermöglicht. Auf diese Weise wurden 120 positive Klone gewonnen. Durch Folgeversuche wurde sichergestellt, dass die Interaktionen reproduzierbar und spezifisch für BBS4 sind. Es verblieben nach diesen Versuchen 102 Klone, die dann sequenziert und durch einen BLAST-Abgleich identifiziert wurden. 19 Interaktionspartner wurden als besonders interessant klassifiziert. Diese Proteine sind teilweise am Fett- und Zuckerstoffwechsel beteiligt, der bei BBS-Patienten gestört ist und wahrscheinlich zur Adipositas führt, oder es besteht eine Beziehung zu den Organen, die bei den BBS-Patienten betroffen sind. Als dritte interessante Gruppe wurden die Proteine bewertet, die in die zelluläre Funktion von BBS4 im Zytoskelett und Mikrotubuliapparat involviert sein können. BBS4 ist

wahrscheinlich an der Ziliogenese beteiligt. Alle Interaktionspartner eröffnen neue Forschungsansätze für weitere Studien mit BBS4.

Darüber hinaus konnten Interaktionen von BBS4 mit den BBS-Proteinen BBS2 und BBS7 aufgezeigt werden. Diese direkte Interaktion der BBS-Proteine liefert einen Beitrag zur Aufklärung der Molekulargenetik, die der Entstehung des Bardet-Biedl-Syndroms zugrunde liegt.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sind viele neue Aspekte der potentiellen Funktion der BBS-Proteine in der Zelle und im menschlichen Gesamtorganismus aufgezeigt worden, die in die komplexe Pathogenese des Bardet-Biedl-Syndroms eingeordnet werden müssen.

VIII Literatur

Ali M., Rellos P., Cox T.M.: Hereditary fructose intolerance. *J. Med. Genet.* **35**(5), 353-65 (1998)

Amara, S. G., Jonas, V., Rosenfeld, M. G., Ong, E. S., Evans, R. M.: Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products. *Nature* **298**, 240-244 (1982)

Ansley S.J., Badano J.L., Blacque O.E., Hill J., Hoskins B.E., Kim J.C., Ross A.J., Lewis R.A., Mah A.K., Johnsen R.C.: Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet–Biedl syndrome. *Nature* **425**, 628–633 (2003)

Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Kim, J.C., Ross, A.J., Eichers, E.R., Teslovich, T.M., Mah, A.K., Johnsen, R.C., Cavender, J.C., Lewis, R.A., Leroux, M.R., Beales, P.L., Katsanis, N.: Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome. *Nature* **425**(6958), 628-33 (2003)

Asano, K., Vornlocher, H.-P., Richter-Cook, N. J., Merrick, W. C., Hinnebusch, A. G., Hershey, J. W. B.: Structure of cDNAs encoding human eukaryotic initiation factor 3 subunits: possible roles in DNA binding and macromolecular assembly *J. Biol. Chem.* **272**, 27042-27052 (1997)

Audebert, M., Chevillard, S., Levalois, C., Gyapay, G., Vieillefond, A., Klijanienko, J., Vielh, P., El Naggar, A. K., Oudard, S., Boiteux, S., Radicella, J. P.: Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res.* **60**, 4740-4744 (2000)

Badano J.L., Ansley S.J., Leitch C.C., Lewis R.A., Lupski J.R., Katsanis N.: Identification of a novel Bardet–Biedl syndrome protein, BBS7, that shares structural features with BBS1 and BBS2. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 650–658 (2003)

Badano JL, Kim JC, Hoskins BE, Lewis RA, Ansley SJ, Cutler DJ, Castellan C, Beales PL, Leroux MR, Katsanis N.: Heterozygous mutations in BBS1, BBS2 and BBS6 have a potential epistatic effect on Bardet-Biedl patients with two mutations at a second BBS locus. *Hum. Mol. Genet.* **12**(14), 1651-9 (2003)

Bardet, G.: Sur un syndrome d'obesite infantile avec polydactylie et retinite pigmentaire (contribution a l'etude des formes clinique de l'obesite hypophysaire). *PhD thesis, Paris* (1920)

Bardet, G.: A congenital obesity syndrome with polydactyly and retinitis pigmentosa (a contribution to the study of clinical forms of hypophyseal obesity). [classical article ; 1922]. *Obes Res.* **3** (4), 387-399. (1995)

Beales PL, Badano JL, Ross AJ, Ansley SJ, Hoskins BE, Kirsten B, Mein CA, Froguel P, Scambler PJ, Lewis RA, Lupski JR, Katsanis N.: Genetic interaction of BBS1 mutations with alleles at other BBS loci can result in non-Mendelian Bardet-Biedl syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **72(5)**, 1187-99 (2003)

Beales, P.L., Katsanis, N., Lewis, R.A., Ansley, S.J., Elcioglu, N., Raza, J. Woods, J.S. Green, M.O., Parfrey, P.S., Davidson, W.S. und Lupski, J.R.: Genetic and mutational analyses of a large multiethnic Bardet-Biedl cohort reveal a minor involvement of BBS6 and delineate the critical intervals of other loci. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 606-16 (2001)

Beales, P.L., N. Elcioglu, A.S. Woolf, D. Parker und F.A. Flintner.: New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J. Med. Genet.* **36**, 437-46 (1999)

Beales, P.L., Reid, H.A., Griffiths, M.H., Maher, E.R., Flintner, F.A. und Woolf, A.S.: Renal cancer and malformations in relatives of patients with Bardet- Biedl syndrome. *Nephrol. Dial. Transplant.* **15**, 1977-85 (2000)

Beales, P.L., Warner, A.M., Hitman, G.A., Thakker, R. und Flintner, F.A.: Bardet-Biedl syndrome: a molecular and phenotypic study of 18 families. *J Med Genet.* 34:92-8 (1997)

Benit, P., Slama, A., Cartault, F., Giurgea, I., Chretien, D., Lebon, S., Marsac, C., Munnich, A., Rotig, A., Rustin, P.: Mutant NDUF3 subunit of mitochondrial complex I causes Leigh syndrome. *J. Med. Genet.* **41(1)**, 14-7 (2004)

Bennett, M. J., Weinberger, M. J., Kobori, J. A., Rinaldo, P., Burlina, A. B.: Mitochondrial short-chain L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: a new defect of fatty acid oxidation. *Pediat. Res.* **39**, 185-188 (1996)

Beutler, E., Scott, S., Bishop, A., Margolis, N., Matsumoto, F., Kuhl, W.: Red cell aldolase deficiency and hemolytic anemia: a new syndrome. *Trans. Assoc. Am. Phys.* **86**, 154-166 (1973)

Biedl, A.: Ein Geschwisterpaar mit adiposo-genitaler Dystrophie. *Deutsch. Med. Wochenschr.* **48**,1630 (1922)

Breslow N.E., Norris R., Norkool P.A., Kang T., Beckwith J.B., Perlman E.J., Ritchey M.L., Green D.M., Nichols K.E.: National Wilms Tumor Study Group: Characteristics and outcomes of children with the Wilms tumor-Aniridia syndrome: a report from the National Wilms Tumor Study Group. *J. Clin. Oncol.* **15**, 4579-85 (2003)

Bruhl, P., Schwanitz, G., Mallmann, R., Muller, S.C. und Raff, R.: [Bardet-Biedl syndrome: aspects of nephro-urology and human genetics]. *Klin. Padiatr.* **213**, 8-12 (2001)

Buselmaier, W. und Tariverdian, G.: Humangenetik. Springer-Verlag (1999)

Castle, J., Roesen, H.M., und Schram, A.: Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome and polydactyly. *J. Foot Ankle Surg.* **32**, 276-279 (1993)

Chagnon, Y., Borecki, I., und Perusse, L.: Genomewide search for genes related to the fat-free body mass in the Quebec family study. *Metabolism* **49**, 203-207 (2000)

Chagnon, Y., Perusse, L., Weisnagel, S., Rankinen, T. und Bouchard, C.: The human obesity gene map: the 1999 update. *Obes. Res.* **8**, 89-117 (2000)

Chiang, A., Nishimura, D., Searby, C., Elbedour, k., Carmi, R., Ferguson, A., Secrist, J., Brau, T., Casavant, T., Stone, E., Sheffield, V.: Comparative genomic analysis identifies an ADP-ribosylation factor-like gene as the cause of Bardet-Biedl syndrome (BBS3). *Am. J. Hum. Genet.* **75(3)**, 475-484 (2004)

Kubo, A., Sasaki, H., Yuba-Kubo, A., Tsukita, S., Shiina, N.: Centriolar satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. *J. Cell Biol.* **147**, 969-979 (1999)

Considine, R., Considine, E. und Williams, C.: mutation screening and identification of a sequence variation in the human ob gene coding region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 735-739 (1996)

Considine, R., Sinha, M. und Heiman, M.: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N. Engl. J. Med.* **334**, 292-295 (1996)

Corbit, K., Aanstad, P., Singla, v ., Norman, A., Stainier, D., Reiter, J.: Vertebrate smoothened functions at the primary cilium. *Letters to Nature*, **437**, 1018-1021 (2005)

Cox G. F., Hansen R. M., Quinn N., Fulton, A. B.: Retinal function in carriers of Bardet-Biedl-Syndrome. *Clinical Sciences*, 804-810 (2003)

Croft, J. and Swift, M.: 1990. Obesity, hypertension, and renal disease in relatives of Bardet-Biedl syndrome sibs. *Am J Med Genet.* **36**:37-42 (1990)

Croft, J., Morrell, D., Chase, C. and Swift, M.: Obesity in heterozygous carriers of the gene for the Bardet-Biedl syndrome. *Am J Med Genet.* **55**, 12-15 (1995)

Cui, Y., Peng, Y., Tian, Q.: Expression of man, a formin homology domain-containing gene in the mouse limb. *Acta physiologica sinica* **57(4)**, 433-438 (2005)

Dammermann A., Merdes A.: Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J. Cell Biol.* **159**, 255–266 (2002)

David, A., Bitoun, P., Lacombe, D., Lambert, J.C., Nivelon, A., Vigneron, J. und Verloes, A.: Hydrometrocolpos and polydactyly: a common neonatal presentation of Bardet-Biedl and McKusick-Kaufman syndromes. *J. Med. Genet.* **36**, 599-603 (1999)

Debeer, P., Peeters, H., Driess, S., De Smet, L., Freese, K., Matthijs, G., Bornholdt, D., Devriendt, K., Grzeschik, K.H., Fryns, JP., Kalff-Suske, M.: Variable phenotype in Greig cephalopolysyndactyly syndrome: clinical and radiological findings in 4 independent families and 3 sporadic cases with identified GLI3 mutations. *Am. J. Med. Genet.* **120A(1)**, 49-58 (2003)

Devarajan, P.: Obesity and genitourinary anomalies in Bardet-Biedl syndrome after renal transplantation. *Pediatr. Nephrol.* **9**, 397-8 (1995)

Driess, S., Freese, K., Bornholdt, D., Kobelt, A., Kress, W., Mortier, G., Radhakrishna, U., Antonarakis, SE., Rauch, A., Suri, M., Verheij, J.B., Woerle, H., Grzeschik, K.H., Kalff-Suske, M.: Gene symbol: GLI3. Disease: Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Hum Genet.* **112(1)**, 103 (2003)

Fan, Y., Esmail, M., Ansley, S., Blacque, O., Boroevich, K., Ross, A., Moore, S., Badano, J., May-Simera, H., Compton, D., Green, J., Lewis, R., van Haelst, m., Parfrey, P., Baillie, D., Beales, D., Katsanis, N., Davidson, W., Leroux, M.: Mutations in a member of Ras superfamily of small GTP-binding proteins cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat. Genet.* **36 (9)**, 989-993 (2004)

Farag, T.I. und Teebi, A.S.: Bardet-Biedl and Laurence-Moon syndromes in a mixed Arab population. *Clin Genet.* **33**, 78-82 (1988)

Fischbach, B., Trout, K., Lewis, J.: Three patients with hallucal polydactyly and WAGR syndrome including discordant expression of Wilms tumor in MZ twins. *Am. J. Genet. A.* **134(4)**, 422-425 (2005)

Friedman, J. und Halaas, J.: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* **395**, 269-272 (1998)

Fuentes, R., Uusitalo, T., Puska, P., Tuomilehto, J., Nissinen, A.: Blood cholesterol level and prevalence of hypercholesterolaemia in developing countries: a review of population-based studies carried out from 1979 to 2002. *J. Cardiovasc. Risk* **10(6)**, 411-19 (2003)

- Gemmill, R. M., Varella-Garcia, M., Smith, D. I., Erickson, P., Golembieski, W., Miller, Y., Coyle-Morris, J., Tommerup, N., Drabkin, H. A.: A 2.5 Mb physical map within 3p21.1 spans the breakpoint associated with Greig cephalopolysyndactyly syndrome. *Genomics* **11**, 93-102 (1991)
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. und Shiestl, R. H.: Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nuc. Acid Res.* **20**, 1425 (1992)
- Goodman, R. M., Smith, E. W., Paton, D., Bergman, R. A., Siegel, C. L., Ottesen, O. E., Shelley, W. M., Pusch, A. L., McKusick, V. A.: Pseudoxanthoma elasticum: a clinical and histopathological study. *Medicine* **42**, 297-334 (1963)
- Green, J.S., Parfrey, P.S., Harnett, J.D, Farid, N.R., Cramer, B.C., Johnson, G., Heath, P.J. McManamon, O., O'Leary, E. und Pryse-Phillips, W.: The cardinal manifestations of Bardet-Biedl syndrome, a form of Laurence-Moon-Biedl syndrome. *N Engl J Med.* **321**, 1002-9 (1989)
- Goode, B., Drubin, D., Barnes, G.: Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol* **12(1)**, 63-71 (2000)
- Gulesserian, T., Kim, S., Fountoulakis, M., Iubee, G.: Aberrant expression of centractin and capping proteins, integral constituents of the dynactin complex, in fetal down syndrome brain. *Biochem Biophys Res Commun* **291(1)**, 62-67 (2002)
- Habets, G. G. M., van der Kammen, R. A., Willemsen, V., Balemans, M., Wiegant, J., Collard, J. G.: Sublocalization of an invasion-inducing locus and other genes on human chromosome 7. *Cytogenet. Cell Genet.* **60**, 200-205 (1992)
- Halaas, J., Büsing, B., und Maffei, M.: Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* **269**, 543-546 (1995)
- Harper J. W., Adami G.R., Wei M., Keyomarsi K., Elledge S. J.: The p21 Cdk interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1-dependant cyclin kinases. *Cell* **75**, 805-816 (1993)
- Hazarika, P., Dham, N., Patel, P., Cho, M., Weidner, D., Goldsmith, L., Duvic, M.: Flotillin 2 is distinct from epidermal surface antigen (ESA) and is associated with filopodia formation. *J. Cell. Biochem.* **75**, 147-159 (1999)
- Hebebrand, J., Heseker, H., Himmelmann, G., Schäfer, H., Remschmidt, H.: Altersperzentilen für den Body mass index aus Daten der Nationalen Verzehrstudie einschließlich einer Übersicht zu relevanten Einflußfaktoren. *Aktuelle Ernährungsmed.* **19**, 259-265 (1994)

Hebebrand, J., Hinney, A. und Oeffner, F.: Molekulare Grundlagen der Adipositas in Endokrinopathien: Hrsg.: Ganten, D. und Ruckpaul, K.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2001)

Heymsfield, S., Allison, D., Wang, Z., Baumgartner, R. und Ross, R.: Evaluation of total and regional body composition. In "Handbook of obesity" by Bray, A., Bouchard, C. und James, W. (1998)

Hirokawa, N., Sato-Yoshitake, R., Yoshida, T. and Kawashima, T.: Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J. Cell Biol.* **111**, 1027–1037 (1990)

Holzbaur, E., LaMonte, B., Wallace, K., Holloway, B., Shelly, S., Ascano, J., Tokito, M., Van Winkle, T., Howland, D.: Disruption of Dynein/Dynactin inhibits Axonal transport in motor neurons causing Late-onset progressive degeneration. *Neuron* **34**, 715-727 (2002)

Hurst, J. A., Baraitser, M., Winter, R. M.: A syndrome of mental retardation, short stature, hemolytic anemia, delayed puberty, and abnormal facial appearance: similarities to a report of aldolase A deficiency. *Am. J. Med. Genet.* **28**, 965-970 (1987)

Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, V.: High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990)

James P., Haliaday J., Craig, E. A.: Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**, 1425-1436 (1996)

Karet, F.E., Finbergm, K.E., Nelson, R.D., Nayir, A., Mocan, H., Sanjad, S.A., Rodriguez-Soriano, J., Santos, F., Cremers, C.W., Di Pietro, A., Hoffbrand, B.I., Winiarski, J., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Dusunsal, R., Goodyer, P., Hulton, S.A., Wu, D.K., Skvorak, A.B., Morton, C.C., Cunningham, M.J., Jha, V., Lifton, R.P.: Mutations in the gene encoding B1 subunit of H⁺-ATPase cause renal tubular acidosis with sensorineural deafness. *Nat. Genet.* **21(1)**, 84-90 (1999)

Katsanis, N., Ansley, S.J., Badano, J.L., Eichers, E.R., Lewis, R.A., Hoskins, B.E., Scambler, P.J., Davidson, W.S., Beales, P.L. und Lupski, J.R.: Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science*. **293**, 2256-9 (2001)

Katsanis, N., Beales, P.L., Woods, M.O., Lewis, R.A., Green, J.S., Parfrey, P.S., Ansley, S.J., Davidson, W.S. und Lupski, J. R.: Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat. Genet.* **26**, 67-70 (2000)

Katsanis, N., Lewis, R.A., Stockton, D.W., Mai, D.W., Baird, L., Beales, P.L., Leppert, M. und Lupski, J.R.: Delineation of the critical interval of Bardet-Biedl syndrome 1

(BBS1) to a small region of 11q13, through linkage and haplotype analysis of 91 pedigrees. *Am J Hum Genet.* **65**, 1672-9 (1999)

Katsanis, N., Lupski, J.R. und Beales, V.: Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2293-9 (2001)

Katsanis, N.: The oligogenic properties of Bardet-Biedl syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **13** Spec No 1, R65-71 (2004)

Katzmarzyk P. T., Craigh C. L., Bouchard C.: Underweight, overweight and obesity: relationships with mortality in the 13- year follow-up of the Canada Fitness Survey. *J Clin Epidemiol* **54**, 916-920 (2001)

Katzmarzyk PT, Craigh CL und Bouchard C: Original Article Underweight, overweight and obesity: relationships with mortality in the 13- year follow-up of the Canada Fitness Survey. *J. Clin. Epidemiol.* **54**, 916-920 (2001)

Kedes, L., Ng, S.-Y., Lin, C.-S., Gunning, P., Eddy, R., Shows, T., Leavitt, J.: The human beta-actin multigene family. *Trans. Assoc. Am. Phys.* **98**, 42-46 (1985)

Kim, J.C., Badano, J.L., Sibold, S., Esmail, M.A., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch, C.C., Venner, K., Ansley, S.J., Ross, A.J., Leroux, M.R., Katsanis, N., Beales, P.L.: The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat. Genet.* **36**(5), 462-70 (2004)

Klein, D. und Amman, V.: The syndrome of Laurence-Moon-Bardet-Biedl and allied disease in Switzerland. Clinical generic, and epidemiological studies. *J. Neurol. Sci.* **9**, 479-513 (1969)

Kubo A., Sasaki H., Yuba-Kubo A., Tsukita S., Shiina N. Centriolar satellites: Molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis. *J. Cell Biol.* **147**(7), 969-80 (1999)

Li, J., Gerdes, J., Havcraft, C., Fan, Y., Teslovich, T., May-Simera, H., Li, H., Blacque, O., Li, L., Leitch, C., Lewis, R., Green, J., Parfrey, P., Leroux, M., Davidson, W., Beales, P., Guay-Woodford, L., Yoder, B., Stormo, G., Katsanis, n., Dutcher, S.: Comparative genomics identifies a flagellar and basal body proteome that includes the BBS5 human disease gene. *Cell* **117**(4), 541-552 (2004)

Loeffen, J. L. C. M., Triepels, R. H., van den Heuvel, L. P., Schuelke, M., Buskens, C. A. F., Smeets, R. J. P., Trijbels, J. M. F., Smeitink, J. A. M.: cDNA of eight nuclear encoded subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase: human complex I cDNA characterization completed. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **253**, 415-422 (1998)

Mass R.E., Smith W.R., Walsh J.R.: The association of hereditary fructose intolerance and renal tubular acidosis. *Am J Med Sci.* **251(5)**, 516-23 (1966)

Mock D.M., Perman J.A., Thaler M., Morris R.C. Jr.: Chronic fructose intoxication after infancy in children with hereditary fructose intolerance. A cause of growth retardation. *N Engl J Med.* **309(13)**, 764-70 (1983)

Moll, P.P., Burns, T.L., Lauer, R.M.: The genetic and environmental sources of body mass index variability: the Muscatine Ponderosity Family Study. *Am. J. Hum. Genet.* **49(6)**, 1243-55 (1991)

Munder, t., Ninkovic, M., Rudakoff, B.: The two-hybrid system in yeast: applications in biotechnology and basic research. *Biotech. Annu. Rev.* **3**, 31-58 (1997)

Mykytyn, K. N., D.Y., Searby, C.C., Beck G., Bugge K., Haines H.L., Cornier A.S., Cox G.F., Fulton A.B., Carmi R.: Evaluation of complex inheritance involving the most common Bardet-Biedl Syndrome locus (BBS1). *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 429-437 (2003)

Mykytyn, K., T. Braun, R. Carmi, N.B. Haider, C.C. Searby, M. Shastri, G. Beck, A.F. Wright, A. Iannaccone, K. Elbedour, R. Riise, A. Baldi, A. Raas-Rothschild, S.W. Gorman, D.M. Duhl, S.G. Jacobson, T. Casavant, E.M. Stone und V.C. Sheffield: Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4. *Nat. Genet.* **28**, 188-91 (2001)

Narahara, K., Baker, E., Ito, S., Yokoyama, Y., Yu, S., Hewitt, D., Sutherland, G. R., Eccles, M. R., Richards, R. I.: Localisation of a 10q breakpoint within the PAX2 gene in a patient with a de novo t(10;13) translocation and optic nerve coloboma-renal disease. *J. Med. Genet.* **34(3)**, 213-6 (1997)

Neel, J., Weder, A. und Julius, S.: Type II diabetes, essential hypertension, and obesity as „syndromes of impaired genetic homeostasis“: the “thrifty genotype” hypothesis enters te 21st century. *Perspect Biol. Med.* **42**, 44-74 (1998)

Neel, J.V.: Diabetes mellitus: a thrifty genotype rendered detrimental by progress. *Am J Hum. Genet.* **14**, 353-362 (1962)

Nishimura, D.Y., C.C. Searby, R. Carmi, K. Elbedour, L. Van Maldergem, A.B. Fulton, B.L. Lam, B.R. Powell, R.E. Swiderski, K.E. Bugge, N.B. Haider, A.E. Kwitek-Black, L. Ying, D.M. Duhl, S.W. Gorman, E. Heon, A. Iannaccone, D. Bonneau, L.G. Biesecker, S.G. Jacobson, E.M. Stone und V.C. Sheffield: Positional cloning of a novel gene on chromosome 16q causing Bardet- Biedl syndrome (BBS2). *Hum. Mol. Genet.* **10**, 865-74 (2001)

- Ochi, H.; Horiuchi, I.; Araki, N.; Toda, T.; Araki, T.; Sato, K.; Murai, H.; Osoegawa, M.; Yamada, T.; Okamura, K.; Ogino, T.; Mizumoto, K.; Yamashita, H.; Saya, H.; Kira, J.: proteomic analysis of human brain identifies alpha-enolase as a novel autoantigen in Hashimoto's encephalopathy. *FEBS Lett.* **528**, 197-2002 (2002)
- O'Dea, D., P.S. Parfrey, J.D. Harnett, D. Hefferton, B.C. Cramer und J. Green: The importance of renal impairment in the natural history of Bardet- Biedl syndrome. *Am. J. Kidney Dis.* **27**, 776-83 (1996)
- Palazzo, A., Joseph. H., Chen, Y., Dujardin, D., Alberts, A., Pfister, K., Vallee, R., Gundersen, G.: Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr. Biol.* **11(19)**, 1536-41 (2001)
- Paschal, B.M. and Vallee, R.B.: Retrograde transport by the microtubule associated protein MAP 1C. *Nature* **330**, pp. 181-183 (1987)
- Pietalainen, K., Kaprio, J. und Rissanen, A.: Distribution and heritability of BMI in Finnish adolescents aged 16y and 17y: a study of 4884 twins and 2509 singletons. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **23**, 107-115 (1999)
- Rexrode K. M., Hennekens C. H., Willett W. C. et al.: A prospective study of body mass index, weight change, and risk of stroke in women. *JAMA* **277**, 1539-1545 (1997)
- Riise, R., S. Andreasson, M.K. Borgstrom, A.F. Wright, N. Tommerup, T. Rosenberg und K. Tornqvist: Intrafamilial variation of the phenotype in Bardet-Biedl syndrome. *Br. J. Ophthalmol.* **81**, 378-85 (1997)
- Rose, Winston und Hieter: Methods in yeast genetics. (1992)
- Rosenbaum J. L., Witman, G. B.: Intraflagellar transport. *Nature Mol. Cell Biol.* **3**, 813-825 (2002)
- Rosenfeld, M. G., Lin, C. R., Amara, S. G., Stolarsky, L., Roos, B. A., Ong, E. S., Evans, R. M.: Calcitonin mRNA polymorphism: peptide switching associated with alternative RNA splicing events. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **79**, 1717-1721 (1982)
- Rosenfeld, M. G., Mermod, J.-J., Amara, S. G., Swanson, L. W., Sawchenko, P. E., Rivier, J., Vale, W. W. und Evans, R. M.: Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* **304**, 129-135 (1983)
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1998)
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-7 (1977)

Sanyanusin, P., McNoe, L. A., Sullivan, M. J., Weaver, R. G., Eccles, M. R.: Mutation of PAX2 in two siblings with renal-coloboma syndrome. *Hum. Molec. Genet.* **4**, 2183-2184 (1995)

Scortegagna, M., Ding, K., Oktay, Y., Gaur, A., Thurmond, F., Yan, L.-J., Marck, B. T., Matsumoto, A. M., Shelton, J. M., Richardson, J. A., Bennett, M. J., Garcia, J. A.: Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1* $-/-$ mice. *Nature Genet.* **35**, 331-340 (2003)

Sheffield, V., Carmi, R. und Kwitek-Black, A.: Identification of a Bardet-Biedl-Syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1331-1335 (1994)

Sheffield, V.C., D. Nishimura und E.M. Stone: The molecular genetics of Bardet-Biedl syndrome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 317-21 (2001)

Sheffield, V.C., R. Carmi, A. Kwitek-Black, T. Rokhlina, D. Nishimura, G.M. Duyk, K. Elbedour, S.L. Sunden und E.M. Stone: Identification of a Bardet-Biedl syndrome locus on chromosome 3 and evaluation of an efficient approach to homozygosity mapping. *Hum. Mol. Genet.* **3**, 1331-5 (1994)

Slavotinek, A.M. und L.G. Biesecker: Phenotypic overlap of McKusick-Kaufman syndrome with bardet-biedl syndrome: a literature review. *Am. J. Med. Genet.* **95**, 208-15 (2000)

Slavotinek, A.M., E.M. Stone, K. Myktyyn, J.R. Heckenlively, J.S. Green, E. Heon, M.A. Musarella, P.S. Parfrey, V.C. Sheffield und L.G. Biesecker: Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat. Genet.* **26**, 15-6 (2000)

Struk, B., Neldner, K. H., Rao, V. S., St Jean, P., Lindpaintner, K.: Mapping of both autosomal recessive and dominant variants of pseudoxanthoma elasticum to chromosome 16p13.1. *Hum. Molec. Genet.* **6**, 1823-1828 (1997)

Su, G., Roberts, T., Cowell, J. K.: TTC4, a novel human gene containing the tetratricopeptide repeat and mapping to the region of chromosome 1p31 that is frequently deleted in sporadic breast cancer. *Genomics* **55**, 157-163 (1999)

Teebi, A.S.: Autosomal recessive disorders among Arabs: an overview from Kuwait. *J. Med. Genet.* **31**, 224-33 (1994)

Tein, I., De Vivo, D. C., Hale, D. E., Clarke, J. T. R., Zinman, H., Laxer, R., Shore, A., DiMauro, S.: Short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency in muscle: a new case for recurrent myoglobinuria and encephalopathy. *Ann. Neurol.* **30**, 415-419 (1991)

Tian, H., Hammer, R. E., Matsumoto, A. M., Russell, D. W., McKnight, S. L.: The hypoxia-responsive transcription factor EPAS1 is essential for catecholamine homeostasis and protection against heart failure during embryonic development. *Genes Dev.* **12**, 3320-3324 (1998)

Tian, H., McKnight, S. L., Russell, D. W.: Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* **11**, 72-82 (1997)

Tiller-Borcich, J. K., Capili, H., Gordan, G. S.: Human brain calcitonin gene-related peptide (CGRP) is concentrated in the locus caeruleus. *Neuropeptides* **11**, 55-61 (1988)

Vortkamp, A., Gessler, M., Grzeschik, K.H.: GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* **352(6335)**, 539-40 (1991)

Wistow, G. J., Lietman, T., Williams, L. A., Stapel, S. O., de Jong, W. W., Horwitz, J., Piatigorsky, J.: Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. *J. Cell Biol.* **107**, 2729-2736 (1988)

Woods, M., Young, T., Parfrey, P., Hefferton, D., Green, J., Davidson, W.: Genetic heterogeneity of Bardet-Biedl-Syndrome in a distinct Canadian population: evidence for a fifth locus. *Genomics* **55(1)**, 2-9 (1999)

Woychik, R. P., Maas, R. L., Zeller, R., Vogt, T. F., Leder, P.: 'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb-deformity gene. *Nature* **346**, 850-853 (1990)

Young, T.L., L. Penney, M.O. Woods, P.S. Parfrey, J.S. Green, D. Hefferton und W.S. Davidson: A fifth locus for Bardet-Biedl syndrome maps to chromosome 2q31. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 900-4 (1999)

Young, T.L., M.O. Woods, P.S. Parfrey, J.S. Green, D. Hefferton und W.S. Davidson: A founder effect in the newfoundland population reduces the Bardet- Biedl syndrome I (BBS1) interval to 1 cM. *Am. J. Hum. Genet.* **65**, 1680-7 (1999)

Young, T.L., M.O. Woods, P.S. Parfrey, J.S. Green, E. O'Leary, D. Hefferton und W.S. Davidson: Canadian Bardet-Biedl syndrome family reduces the critical region of BBS3 (3p) and presents with a variable phenotype. *Am. J. Med. Genet.* **78**, 461-467 (1998)

Zhang, Y., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. und Friedman, J.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* **372**, 425-432 (1994)

Ziegler, A. und Hebebrand, J.: Sample size calculations for linkage analysis using extreme sib pairs based on segregation analysis with the quantitative phenotype body weight as an example. *Gent. Epidemiol.* **15**, 577-593 (1998)

IX Anhang

IX.1 Lebenslauf

Name	Andrea Neundorf
Geburtsdatum	26.9.1977
Eltern	Rolf Neundorf, Diplomingenieur der Elektrotechnik Waltraud Neundorf, geb. Kreh, Diätassistentin
Geschwister	Carsten Neundorf, Diplom-Mathematiker und –Informatiker
Familienstand	Ledig

Bildungsgang

Schulbesuch	1984-1988	Grundschule in Wrexen
	1988-1997	Christian-Rauch-Gymnasium in Bad Arolsen Abschluss mit Abitur (<i>1,0</i>)
Studium	1997 (WS)	Beginn des Studiums der Humanbiologie, Philipps-Universität Marburg
	1999	Vordiplom Humanbiologie (<i>sehr gut</i>)
	1999 (WS)	Beginn des Studiums der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
	2000	ärztliche Vorprüfung (<i>gut</i>)
	2001	Diplomprüfung Humanbiologie (<i>sehr gut</i>)
	2001-2002	Diplomarbeit im Hauptfach Molekularbiologie (<i>sehr gut</i>)
	2003	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (<i>gut</i>)
	2004	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (<i>gut; 1,66</i>)

	2004-2005	Absolvierung des Praktischen Jahrs am Klinikum Kassel mit Wahlfach Neurologie
	2005	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (<i>sehr gut</i>)
	12.01.2006	Approbation als Ärztin
Famulaturen und Praktika		Innere Medizin im St. Vincenz-Krankenhaus Paderborn Chirurgie im Stadtkrankenhaus Bad Arolsen Praxisfamulatur ambulante Chirurgie bei Durchgangsarzt Dr. med. Ferber in Paderborn Genetik im Institut für Humangenetik Marburg Neurologie im Sygehus Aalborg, Dänemark
Wissenschaftliche Arbeiten		Diplomarbeit Humanbiologie: Charakterisierung von Npl3p, Nab2p und Ngr1p im nucleo-cytoplasmatischen Transport Doktorarbeit Humanmedizin: Analyse von Proteininteraktionen beim Bardet-Biedl-Syndrom mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems

IX.2 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Bastians, Baum, Bien, Celik, Cetin, Christiansen, Czubayko, Dalchow, Daut, Eissele, Elsässer, Engel, Feuser, Frenking, Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Gotzen, Griss, Grzeschik, Happel, Hartmann, Hasilik, Heeg, Hesse, Hoffmann, Hofmann, Hörsch, Joseph, Junge, Kaiser, Katschinski, Kern, Klenk, Klose, Koolmann, Kontermann, Krebber, Lang, Lennartz, Lill, Löffler, Lorenz, Maisch, Mc Gregor, Meinhardt, Moll, Moosdorf, Müller, Oertel, Petermann, Pfeiffer, Radsak, Ramaswamy, Renneberg, Rechzeh, Reichardt, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rogausch, Rosenow, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schneider, Schneyer, Schulz, Steiniger, Stief, Stiletto, Tampe, Vogelmeier, Vohland, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wichert, Wille, Wirth, Wulf und Zwioere.

Meine akademischen Lehrer in Kassel waren die Damen und Herren:

Feige, Ferbert, Forster, Grosche, Herath, Hinterthaler, Klammer, Neuzner, Pausch, Raible, Schäfer, Stuewe, Tscherner

IX.3 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Grzeschik für die freundliche Überlassung des Themas und seinen stets freundlichen Rat und Beistand in allen Belangen. Insbesondere seine große naturwissenschaftliche Übersicht und die daraus entstehenden Anregungen waren beeindruckend und hilfreich.

Ich danke meiner Freundin und Mitstreiterin im täglichen Laboralltag Frau Claudia Moch für die schönen und anstrengenden Stunden bei der Arbeit.

Ich möchte der gesamten Arbeitsgruppe Grzeschik Dank sagen für die freundliche Atmosphäre.

Frau Dorothea Bornholt danke ich, deren Einsatz für die wissenschaftliche Arbeit unverzichtbar war.

Ich danke Frau Daniela Lerche für die Einarbeitung bei der Sequenzierung und ihre sonstige Hilfe.

Ein ganz besonderer Dank gilt wie in allen Dingen meinem Verlobten Herrn Dr. Jan Hermesmeier und seiner kompetenten und liebevollen Unterstützung in allen Phasen der Entstehung dieser Arbeit.

Ich danke meinen Eltern für die immerwährende Unterstützung und ihren Glauben an meine Fähigkeiten.

IX.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel Analyse von Proteininteraktionen beim Bardet-Biedl-Syndrom mit Hilfe des Yeast-Two-Hybrid-Systems im Med. Zentrum für Humangenetik unter Leitung von Prof. Grzeschik ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe, Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den

Andrea Neundorf